# Zur Kenntnis der Glyoxalasen und ihrer optischen Spezifität. Zur Kenntnis der Antiglyoxalase.

---

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Philosophischen Fakultät (II. Sektion)
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Eugen Werle**

aus Kaiserslautern.

München 1928

Druck der Salesianischen Offizin.

# Zur Kenntnis der Glyoxalasen und ihrer optischen Spezifität.

# Zur Kenntnis der Antiglyoxalase.

---

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Philosophischen Fakultät (II. Sektion)
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Eugen Werle**

aus Kaiserslautern.

München 1928

Druck der Salesianischen Offizin.

BIBLIOTHEEK
RIJKS
UNIV.
LEIDEN

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit!

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung von Herrn Prof. Dr. RICHARD KUHN und wurde ausgeführt im Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München und im Chemischen Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich.

Für die stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit spreche ich meinem hochverehrten Lehrer meinen aufrichtigen Dank aus.

Herrn Geheimrat Prof. Dr. R. WILLSTÄTTER und Herrn Geheimrat Prof. Dr. H. WIELAND danke ich ergebenst für die Anteilnahme an meinem Studiengang.

# Disposition.


Seite

I. Vorkommen und Bedeutung der Glyoxalase . . . . . 11
II. Zur optischen Spezifität der Glyoxalasen . . . . . 16
a) Einführung . . . . . 16
b) Quantitative Bestimmung der Mandelsäure . . . 17
c) Tierische Glyoxalasen . . . . . 20
d) Pflanzliche Glyoxalasen . . . . . 20
1. Erbsenglyoxalase . . . . . 20
2. Grünmalz . . . . . 21
3. Hefeglyoxalase . . . . . 21
III. Charakterisierung der Hefeglyoxalasen . . . . . 22
IV. Zur Theorie der Glyoxalasewirkung . . . . . 24
V. Versuch einer nichtenzymatischen asymmetrischen Katalyse der inneren Cannizzaroreaktion bei Phenylglyoxalhydrat . 29
VI. Phenylglyoxal und gärende Hefe . . . . . 29
VII. Beschreibung der Versuche . . . . . 30
A. Präparativer Teil . . . . . 30
a) Darstellung des Substrates . . . . . 30
b) Kondensationsprodukte des Phenylglyoxals . . . 33
1. Kondensation mit Glykokollesterchlorhydrat . . 33
2. Kondensation mit o.Phenylendiamin . . . . 34
B. Ausführung der Versuche einer nichtenzymatischen Katalyse der inneren Cannizzaroreaktion . . . . . 35
a) Phenylglyoxal und Codein . . . . . 35
b) Phenylglyoxal und Nikotin . . . . . 35
C. Phenylglyoxal und gärende Hefe . . . . . 35
D. Analytischer Teil . . . . . 36
a) Jodometrische Bestimmung von Benzaldehyd . . . 36
b) Bestimmung der Mandelsäure . . . . . 37
c) Bestimmung der Milchsäure . . . . . 38
d) Zur Frage des Reaktionsmechanismus . . . . 39
e) Oxydation von Oxysäuren, Aminosäuren und Zuckern . 40
E. Enzymatischer Teil . . . . . 41
a) Ausführung der Bestimmungen . . . . . 41
b) Leerversuche . . . . . 42
c) Tierische Glyoxalasen . . . . . 43
d) Pflanzliche Glyoxalasen . . . . . 45
1. Kartoffeln . . . . . 45
2. Gelbrüben . . . . . 45
3. Erbsen . . . . . 45
Änderung der optischen Spezifität beim Lösungsvorgang der Erbsenglyoxalase . . . . . 46
4. Grünmalz . . . . . 47
Prüfung verschiedener Malzauszüge . . . . 47

Seite

5. Champignons . . . . . 48
6. Hefeglyoxalasen . . . . . 48
a) Herstellung der Autolysate . . . . . 48
b) Aktivitäts-pH-Kurve . . . . . 48
c) Phenylglyoxalkonzentration und Reaktionsgeschwind. 49
d) Glyoxalasemenge und Reaktionsgeschwindigkeit . 49
e) Temperaturoptimum . . . . . 51
f) Zeitlicher Verlauf . . . . . 51
g) Lebende Hefe . . . . . 55
Beispiele für Wirksamkeit und optische Spezifität verschiedener Hefen . . . . . 55
h) Versuche mit Trockenhefe . . . . . 56
i) Autolysedauer und Enzymmenge . . . . . 57
j) Änderung der optischen Spezifität bei der Autolyse 57
k) Haltbarkeit der Hefeglyoxalase . . . . . 58

VIII. Über das Adsorptionsverhalten der Leber- und Hefeglyoxalase 59
A. Adsorption von Hefe- und Leberenzym . . . . . 59
1. Ausführung der Versuche . . . . . 59
a. Beim Hefeenzym . . . . . 59
b. Beim Leberenzym . . . . . 59
2. Adsorptionsverhalten des Hefeenzyms . . . . . 60
3. Adsorptionsverhalten des Leberenzyms . . . . . 61
B. Elution von Hefe- und Leberenzym . . . . . 62
1. Ausführung der Versuche . . . . . 62
2. Elution des Hefeenzyms . . . . . 62
3. Elution des Leberenzyms . . . . . 62
C. Änderung der Spezifität durch Reinigung . . . . . 63
D. Weitere Reinigungsmöglichkeiten für die Leberglyoxalase . 64

# Zur Kenntnis der Glyoxalasen und ihrer optischen Spezifität.

# I. Vorkommen und Bedeutung der Glyoxalase.

Bis zur Durchführung dieser Arbeit sind nur von H. D. Dakin und H. W. Dudley[1] sowie von C. Neuberg[2] Angaben über das Vorkommen der Ketoaldehydmutase gemacht worden. Neuberg und Dakin fanden sie in der Leber und Muskulatur, sowie in fast allen Organen der verschiedensten Tiere, so dass sie wohl als ein nie fehlender Bestandteil des Muskelenzymkomplexes anzusehen ist.[3]

Auch in Hefen haben die beiden Autoren die Glyoxalase gefunden, doch schreibt Neuberg[4]: „ . . . nur mit einer einzigen obergärigen Hefe konnte eine mässige Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure beobachtet werden. Mit Lebedewschem Macerationssaft konnte gleichfalls keine sichere Wirkung auf Methylglyoxal nachgewiesen werden. Dagegen liess ein Macerationssaft aus obergäriger Hefe 12 unzweifelhaft einen nicht unbeträchtlichen Gehalt an Ketoaldehydmutase erkennen.“ Dass die Glyoxalase in Hefen nur selten und in geringer Menge zu finden ist, schien nicht weiter verwunderlich, da ja das Methylglyoxal in der Hefe über Brenztraubensäure zu Acetaldehyd usw. abgebaut und nicht wie im Muskel zu Milchsäure stabilisiert wird. Doch so sehr verschieden wie es bis vor kurzem den Anschein hatte, sind die Abbauwege der Kohlehydrate in diesen beiden Zellarten nicht. Seit der Entdeckung Meyerhofs, dass die in der anaeroben Phase des K. H.-Abbaus gebildete Milchsäure auf Kosten der Verbrennungsenergie eines Teiles derselben wieder zu Glykogen synthetisiert wird, hat man die Anschauung betreffs der Bedeutung der Milchsäure für den K. H.-Abbau im Muskel revidieren müssen: Es ist nämlich nicht einmal sicher, dass Milchsäure weiter abgebaut wird[5] —

[1] II. Biol. Chem. 14, 155 u. 423 (1913); 15, 463 (1914); ferner Bioch. Zs. Bd. 59, 193 (1914); Bd. 71, 245 (1915).

[2] Bioch. Zs. Bd. 49, 502; Bd. 51, 484; Bd. 55, 495 (1913).

[3] D. L. Foster Bioch. I. Bd. 19, S. 757 (1925) findet Glyoxalase in Kaninchenmuskulatur, jedoch nicht in der Leber und schliesst daraus, dass die Milchsäurebildung nicht unbedingt über Methylglyoxal gehen müsse. Doch haben G. Gorr u. G. Perlmann Bioch. Zs. Bd. 174, S. 433 in Kaninchenleber entgegen den Angaben Fosters das Ferment finden können. O. Meyerhof findet Glyoxalase in Rattenmuskulatur, jedoch nicht in Rattenleber. Bioch. Zs. Bd. 159, S. 437.

[4] Bioch. Zs. Bd. 51, S. 490 (1913) u. zw. S. 491.

[5] Diese Anschauung wird namentlich von Graham Lusk vertreten. Bioch. Zs. Bd. 156, S. 334 (1925).

die thermischen und volumetrischen Daten der Meyerhofschen Reaktion stimmen auch auf Kohlehydrat. Es liegt also die Milchsäure vielleicht gar nicht auf dem direkten Abbauweg der Hexosen — sondern es ist wahrscheinlich, dass sie nur vorübergehend zur Regulierung der Muskelarbeit geliefert wird, um, nachdem sie ihren funktionellen Zweck erfüllt hat, wieder in Methylglyoxal und Glykogen zurückverwandelt zu werden. Wie sich der Abbau im Muskel vom Methylglyoxal aus weiter gestaltet, darüber ist nichts bekannt; doch da man Acetaldehyd[6] als Intermediärprodukt hat wahrscheinlich machen können, werden hier wohl die gleichen Wege wie beim K. H.-Abbau der Hefe anzunehmen sein.

Im Hinblick darauf, dass ähnlichen Leistungen der Zellen weitgehend derselbe Fermentapparat zur Verfügung stehen muss, habe ich das Vorkommen der Ketoaldehydmutase in Hefen untersucht, ferner habe ich geprüft, ob dieses Enzym auch in grünen Pflanzen zu finden sei.

Zur Dismutation diente, wie bei den Untersuchungen Dakins Phenylglyoxalhydrat.

Es wurden Hefen von verschiedenen Brauereien und Hefefabriken auf ihren Gehalt an Ketoaldehydmutase untersucht und zwar in frischem Zustand, als Trockenpräparate und in Form von Autolysaten. Die Frischhefen wurden zur Reaktion mit Phosphatpuffer und Phenylglyoxallösung versetzt und nach einer gewissen Zeit das Reaktionsgemisch, wie im experimentellen Teil für tierische Glyoxalase beschrieben, aufgearbeitet. Ebenso wurde mit den Trockenpräparaten und Autolysaten verfahren. Es zeigt sich, dass entgegen den Angaben Neubergs[7] die Hefen durchweg reich an Ketoaldehydmutase sind: Man erhält aus 5 g Frischhefe bei der Autolyse etwa die gleiche Menge Ketoaldehydmutase, die aus 20—25 g gemahlener Schweineleber in Lösung geht.

Sie fehlt in keiner der untersuchten Hefen. Verwendet wurden: Hefen aus der Löwen-, Hacker- und Spatenbrauerei zu München, von den Hefefabriken Sinner A.-G., Bast-Nürnberg und Hefefabrik Olten-Schweiz. Ferner Hefe M vom Institut für Gärungsgewerbe Berlin.

Die Aufsuchung des Enzyms in Samen und Früchten grüner Pflanzen wurde in ähnlicher Weise vorgenommen wie bei den

[6] I. Hirsch: Acetaldehyd als Umsetzungsprodukt atmender Froschmuskulatur. Bioch. Zs. Bd. 117, S. 113 (1921).
I. Hirsch: Acetaldehyd im intermediären Stoffwechsel überlebender Muskulatur. Bioch. Zs. Bd. 134, S. 415 (1923).
S. auch G. Klein u. Pirschle: Acetaldehyd als Zwischenprodukt bei der Pflanzenatmung Bioch. Zs. Bd. 168, S. 340 (1926).

[7] l. c. 4.

Hefen. Die nähere Beschreibung dieser Versuche findet sich ebenfalls im experimentellen Teil. Untersucht wurden: Erbsen, Karotten, Kartoffeln, Grünmalz und Champignons. Karotten und Kartoffeln zeigten weder frisch noch in Autolysaten Glyoxalasewirkung.[8] Dagegen erwiesen sich die Erbsen als stark glyoxalasehaltig. Ich erhielt z. B. mit 10 g frischen, keimenden Erbsen unter sonst gleichen Bedingungen des Versuchs ebensoviel aktive Mandelsäure wie mit 5 g Frischhefe. Auch Auszüge aus Grünmalz[9] der Löwenbrauerei München enthielten nicht geringe Mengen an Ketoaldehydmutase. In Champignons konnte nur geringe Glyoxalasewirkung nachgewiesen werden.

Während bei den Hefen sowie bei tierischem Material das Enzym verhältnismässig leicht in Lösung zu bringen ist, konnte ich es aus der Pflanzenzelle nur schwer und in geringer Ausbeute herauslösen. Die von den Hefen und grünen Pflanzen gebildete Mandelsäure war optisch aktiv und zwar linksdrehend, doch sollen die optischen Verhältnisse der durch die Wirkung der verschiedenen Enzyme entstehenden Oxysäure erst in einem späteren Kapitel Gegenstand der Besprechung sein.

Teils während, teils nach der Ausführung dieser Versuche erschien eine Anzahl Arbeiten, die sich mit dem Vorkommen der Glyoxalasen befassen und fast sämtlich von C. Neuberg und seinen Schülern stammen.[10]

C. Neuberg hat aus ähnlichen Überlegungen heraus wie ich nochmals das Vorkommen der Glyoxalase studiert, da seit der Entdeckung des Fermentes durch C. Neuberg und H. D. Dakin und H. W. Dudley immer gewichtigere Gründe[11] dafür beige-

---

[8] In Übereinstimmung mit H. D. Dakin und H. W. Dudley, die in Kartoffeln ebenfalls keine Ketoaldehydmutase auffinden konnten. Jl. Biol. Chem. Bd. **14**, (1913) und zwar S. 431.

[9] Ludwig Klar fand Ketoaldehydmutase in Weizenkörnern. Bioch. Zs. Bd. **186**, S. 327 (1927).

[10] 1. Untersuchungen mit Bakterien: C. Neuberg und G. Gorr, Bioch. Zs. Bd. **162**, S. 490 (1925); Bd. **166**, S. 482 (1925); G. Gorr und G. Perlmann, Bioch. Zs. Bd. **174**, S. 433 (1926) sowie P. Mayer, Bioch. Zs. Bd. **174**, S. 420 (1926).

2. Untersuchungen mit Pflanzen: C. Neuberg und G. Gorr, Bioch. Zs. Bd. **171**, S. 475 (1926); Bd. **173**, S. 358 (1926); G. Binder Kotrba, Bioch. Zs. Bd. **174**, S. 443 (1926); C. Neuberg und M. Kobel, Bioch. Zs. Bd. **179**, S. 473 (1926).

3. Untersuchungen mit Hefen: C. Neuberg und M. Kobel, Bioch. Zs. Bd. **182**, S. 470 (1927).

Vergl. auch O. Meyerhof, Bioch. Zs. Bd. **159**, S. 437 (1925).

[11] Ein grosses Verdienst für die Kenntnis der intermediären K. H. Stoffwechselprodukte kommt C. Neuberg selber zu. Besonders durch die Einführung der sogen. Abfangverfahren. Vergl. hiezu z. B. C. Neuberg und E. Reinfurth, Bioch. Zs. Bd. **89**, Seite 365 (1918); Bd. **92**, S. 234 (1918).

bracht worden sind, dass das Methylglyoxal in dem Kohlehydratstoffwechsel aller Zellarten des Tier- und Pflanzenreichs eine zentrale Stellung einnimmt: „Im Hinblick auf das Problem, ob in der ganzen belebten Natur eine einheitliche Bedeutung der Milchsäure zur Geltung kommt und ob ihr hauptsächlicher Bildungsmechanismus überall als ähnlich vorausgesetzt werden darf, habe ich untersucht, ob Zellen höherer Pflanzen Methylglyoxal in typischer Weise dismutieren."[12] So fanden C. Neuberg und G. Gorr[13] sowie G. Binder Kotrba[14] z. B. hohe Erfurter Zuckererbsen reich an Glyoxalase und empfehlen dieses Material für reaktionskinetische Messungen über dieses Enzym. Sie verwandten Frischerbsen, Acetontrockenerbsen und alkoholische Fällungen des Erbsenenzyms. Neuberg hat den Kreis seiner Untersuchungen auch auf Bakterien ausgedehnt und gefunden, dass nicht nur Milchsäurebakterien sondern auch Colibakterien und Essigbildner Methyl- bezw. Phenylglyoxal zu dismutieren vermögen.

Besonders interessant sind die Ergebnisse einer Arbeit P. Mayers.[15] Er fand, dass Phenylglyoxal durch Bakterium ascendens (Essigbildner) nahezu vollständig in reine d (—) Mandelsäure übergeführt wird, durch Lactobazillus S 48 $a_3$ dagegen in ebenso guter Ausbeute die rechtsdrehende Form gebildet wird. Abgesehen davon, dass hier auch die nicht körperfremde Konfiguration[16] auftritt, ist durch die Auswahl des Biokatalysators zum ersten Mal das Problem gelöst worden, von einer inaktiven Substanz aus nach beiden Seiten zur quantitativen Bildung der optisch reinen Formen zu gelangen. Neuerdings hat Neuberg[17] unter etwas anderen Bedingungen wie vorher Hefen auf Ketoaldehydmutase untersucht. Er findet nun entgegen seinen früheren Angaben, dass sämtliche untersuchten Hefen Methylglyoxal quantitativ umzusetzen vermögen. Nach den soeben besprochenen Arbeiten und der meinigen besteht also kein Zweifel darüber, dass der Milchsäurebildungsmechanismus in der Tier-, Pflanzen- und Mikrobenzelle überall der gleiche ist: Intermediär auftretendes Methylglyoxal wird durch

---

[12] Zit. C. Neuberg und G. Gorr, Bioch. Zs. Bd. 171 (1926) und zw. S. 475.
[13] Bioch. Zs. Bd. 171, S. 475 (1926); Bd. 173, S. 358 (1926).
[14] Bioch. Zs. Bd. 174, S. 443 (1926).
[15] Bioch. Zs. Bd. 174, S. 420 (1926). — Mit Bakterium Pasteurianum hat Neuberg den Methyl-äthylacetaldehyd zu rechtsdrehendem Amylalkohol dismutiert. (C. Neuberg und E. Simon Bioch. Zs. Bd. 179, S. 443 (1927).
[16] Es ist auffallend, dass die in vivo normalerweise auftretende Fleischmilchsäure (1+Milchsäure) in vitro so selten gebildet wird. Fast sämtliche bisher untersuchten Glyoxalasen bevorzugen die Bildung der d (—) Konfiguration.
[17] C. Neuberg und M. Kobel, Bioch. Zs. Bd. 182, S. 470 (1927).

Glyoxalase zu Milchsäure dismutiert. „Von Gesichtspunkten der Kinetik aus ergeben sich ebenfalls keinerlei Einwendungen gegen die Methylglyoxalhypothese der desmolytischen Milchsäurebildung.“ [18]

Die bisher ausstehende Isolierung des Methylglyoxals ist Kostytschew gelungen. Durch Zusatz von Semicarbazidchlorid zu gärender Hefe konnte er grosse Mengen Methylglyoxal „abfangen“.[19] Auf die nämliche Weise hat Kostytschew bei der Milchsäuregärung[20] die Methylglyoxalstufe festgelegt.

Für die tierische Zelle konnten Toenissen und Fischer[21] sowie E. Aubel[22] das intermediäre Auftreten des Ketoaldehyds wahrscheinlich machen.

Rätselhaft erscheint die Tatsache dass, obwohl beim K. H.-Abbau in der Hefe Methylglyoxal als Intermediärprodukt auftritt, in der Hefezelle, die so reich an Ketoaldehydmutase ist, keine oder nur verschwindend wenig Milchsäure gebildet wird. Wahrscheinlich erfolgen in der Hefezelle die Dehydrierung des Methylglyoxals zu Brenztraubensäure und die kombinierte Dismutation mit Acetaldehyd so schnell, dass für die innere Cannizzaroreaktion kein Methylglyoxal mehr zur Verfügung steht. Wenn wir jedoch dargestelltes Methyglyoxal zu gärender Hefe setzen, so wird es nicht dehydriert zu Brenztraubensäure und nicht mit Acetaldehyd kombiniert dismutiert, sondern es entsteht zum weitaus grössten Teil Milchsäure.[23]

Steht dies im Widerspruch zu unseren Vorstellungen von der Entstehung der Milchsäure in der Zelle und zu der Tatsache, dass Kostytschew das Methylglyoxal in gärender Hefe intermediär abgefangen hat? Keineswegs: wir werden durch diese scheinbaren Widersprüche wieder darauf aufmerksam, dass wir es im Zellgeschehen mit Gleichgewichten zu tun haben zwischen strukturchemisch definierten Stoffen und ihren verschiedenen Hydratstufen, mit Gleichgewichten, die sich je nach den Bedingungen einmal mehr nach der einen, einmal mehr nach der anderen Seite verschieben. „Chemische Körper erhalten wir erst dann, wenn wir präparativ in diese feinen Gespinste hineinfahren und durch unsere Eingriffe die Gleichgewichte verschieben so, dass wir ein

---

[18] Zitiert nach Neuberg, Bioch. Zs. Bd. 182, S. 471 (1927).
[19] H. S. Bd. 168, S. 128 (1927).
[20] H. S. Bd. 168, S. 124 (1927).
[21] H. S. Bd. 161, S. 254 (1926).
[22] C. r. Bd. 183, S. 572 (1926).
[23] Etwa 5% der Theorie werden zu Propylenglykol dehydriert, welches optisch aktiv u. zw. linksdrehend ist. (C. Neuberg und M. Kobel Bioch. Zs. Bd. 182 (1927) u. zw. S. 472.

gerade begünstigtes isolieren und dann nach dem Massengesetz die gesamte Reaktion in diese Richtung zwingen."[24] Damit ist der Wert solcher intermediären „Festlegungen" in keiner Weise in Frage gestellt, sie sind ausserordentlich wichtige Stützpunkte und können zeigen, ob wir mit unseren Theorien auf dem rechten Wege sind.

Es mögen aber auch für die Bildung derjenigen Hydratform des Methylglyoxals, die für die innere Cannizzaroreaktion die geeignete ist, und die in der tierischen und der Bakterienzelle normalerweise gebildet wird, in der Hefezelle die Bedingungen fehlen oder es können Hemmungskörper vorhanden sein, die das Entstehen dieser Form verhindern.

Es soll an dieser Stelle hervorgehoben werden, dass auch in der tierischen Zelle normalerweise die Milchsäure nicht persistiert und nur unter gewissen Bedingungen (Ermüdung, Erstickung, Totenstarre des Muskels) in grösseren Mengen aufgefunden werden kann.

## II. Zur optischen Spezifität der Glyoxalasen.

### a) Einführung.

Die optische Spezifität der Ketoaldehydmutasen ist von Bedeutung für die Frage, ob Ketoaldehyde wie Methylglyoxal als Zwischenprodukte bei der Bildung von Oxysäuren im Organismus auftreten. Die aus Methylglyoxal durch Leber, Muskel und Hefeauszüge entstehende Milchsäure ist nämlich nach C. Neuberg bald linksdrehend, bald racemisch, während die natürliche Fleischmilchsäure rechtsdrehend ist.[25] Diese merkwürdige Tatsache versucht Neuberg durch die Annahme zu erklären, dass im Organismus nicht die bisher allein bekannte Form des Methylglyoxals gebildet wird, sondern eine isomere, halbacetalartige, optisch aktive, mit asymmetrischem C-Atom. Diese Annahme ist wenigstens vorerst noch durch keinerlei anderweitige Beobachtungen gestützt. Sie steht jedenfalls im Widerspruch zu der Anschauung von K. Freudenberg und O. Huber,[26] die für den Übergang von d-Glukose in l-Milch-

---

[24] Zitiert nach Oppenheimer-Kuhn, Lehrbuch der Enzyme S. 197.

[25] Nach G. Embden, K. Baldes und E. Schmitz liefert auch dl-Glycerinaldehyd bei Durchströmung der glykogenarmen Leber ein Gemenge von dl- und d (—) Milchsäure.
Bioch. Zs. Bd. 45, S. 108 (1912) u. zw. S. 123, während S. Oppenheimer unter ähnlichen Bedingungen aus Glycerin die natürliche l (+) Milchsäure erhielt. Bioch. Zs. Bd. 45 S. 30 (1012) u. zw. S. 42.

[26] Chem. Ber. Bd. 58, S. 148 (1924/25).

säure ein optisch inaktives Zwischenprodukt von der Art des Methylglyoxals oder des $\alpha\alpha'$-Dioxyacetons verlangen.[27] Vorläufig kann weder die eine noch die andere Auffassung als erwiesen gelten. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die der d-Reihe angehörige Glukose nicht über ein racemisches beziehungsweise symmetrisches Zwischenprodukt in die der l-Reihe zugehörige (+)-Milchsäure übergeht sondern auf dem Wege optischer Umkehrerscheinungen. Wollte man das Wesentliche der Vorstellungen von C. Neuberg mit der K. Freudenbergs vereinigen, so müsste man mit R. Kuhn[28] annehmen, dass zwischen aktivem 6—C-Zucker und aktiver 3—C-Reihe eine inaktive Stufe liegt. Hierfür gibt es nun nicht die geringsten Anhaltspunkte[29] und man muss wohl versuchen durch neues experimentelles Material die stereochemischen Beziehungen zwischen Zucker und Milchsäure zu erhellen. Die vorliegende Abhandlung will die Bearbeitung der eben aufgeworfenen Fragen durch Vertiefung der Kenntnisse über die stereochemische Eigenart der Ketoaldehydmutasen vorbereiten. Ich habe zunächst die Natur der aus Phenylglyoxal entstehenden Mandelsäure näher untersucht und knüpfe damit an die Arbeiten von H. D. Dakin und H. W. Dudley an.

## b) Quantitative Bestimmung der Mandelsäure.

Die aus Phenylglyoxal durch enzymatische Disproportionierung entstehende Mandelsäure ist nach den Untersuchungen von H.D. Dakin und H.W. Dudley,[30] optisch aktiv und zwar linksdrehend. Es ist jedoch nicht sicher bekannt, ob es sich um die optisch reine Form handelt oder um Gemische von d- (—) mit dl-Mandelsäure. Der Vergleich von optischer Aktivität und Acidität der Ätherextrakte wie ihn Dakin und Dudley durchgeführt haben, liefert kein eindeutiges Bild und gestattet nicht zwischen diesen Möglichkeiten zu entscheiden. Man findet z.B. auch wenn kein Drehungsvermögen festgestellt werden kann, einen nicht unerheblichen und wechselnden Alkaliverbrauch, der anscheinend nicht auf racemi-

---

[27] Das intermediäre Auftreten von Glycerinaldehyd scheinen K. Freudenberg u. O. Huber, da diese Substanz bei ihrer Bildung aus Glukose in optisch aktiver Form auftreten sollte, für weniger wahrscheinlich zu halten.

[28] S. R. Heckscher: Über enzymatische Milchsäurebildung. Inaug.-Diss. München 1927 u. zw. S. 18.

[29] Dies steht nicht im Widerspruch zu der Tatsache, dass Kostytschew Methylglyoxal intermediär abgefangen hat. Vergl. hierzu die Ausführungen S. 15 und 16.

[30] Jl. Biol. Chem. Bd. 14, S. 155; S. 423 (1913); Bd. 15, S. 463 (193); Bd. 16, S. 505 (1913/14).

sche Mandelsäure sondern auf andere ätherlösliche, saure Bestandteile der Enzymlösungen zurückzuführen ist.

Zur quantitativen Bestimmung der optisch aktiven Mandelsäure diente das von Dakin und Dudley[31] angegebene Verfahren. Zur Bestimmung der Gesamtmandelsäure habe ich eine besondere Methode ausgearbeitet. Sie beruht auf der Beobachtung, dass Mandelsäure bei der Oxydation mit Permanganat in siedender, verdünnt schwefelsaurer Lösung in Benzaldehyd übergeht, der aus dem Reaktionsgemisch leicht abdestilliert werden kann. Den Benzaldehyd habe ich durch Überführung in Benzaldazin vom Schmelzpunkt 93° identifiziert. Unter den im experimentellen Teil beschriebenen Bedingungen liefert Mandelsäure durchschnittlich 95 $\pm$ 1% der berechneten Aldehydmenge, die wir nach dem Verfahren von Ripper[32] titrieren. Von Wichtigkeit für die Enzymversuche ist es, dass Phenylglyoxal im Gegensatz zur Mandelsäure keinen Benzaldehyd liefert.[33] Doch muss bei Versuchen, die bei hohem pH durchgeführt werden, berücksichtigt werden, dass ausser der enzymatischen eine unspezifische Dismutation des Phenylglyoxals stattfindet, was namentlich bei langer Versuchsdauer erhöhte Bildung racemischer Mandelsäure durch das Enzym vortäuscht. Die mit der Mandelsäure in die Ätherauszüge übergehenden Bestandteile der Enzymlösungen geben bei der Oxydation mit Permanganat wechselnde Mengen bisulfitbindender Substanz, die jeweils zur Korrektur der Bestimmungen an Hand von entsprechenden Leerversuchen ermittelt werden müssen.

Für den oxydativen Abbau von α-Oxysäuren zu den nächst niederen Aldehyden, wie er der Milchsäurebestimmung von O. von Fürth und D. Charnass[34] und meiner Bestimmung der Mandelsäure zugrunde liegt, stehen zwei Reaktionsmechanismen zur Diskussion.

1. Es findet zunächst Kohlensäureabspaltung statt; der hiebei entstehende Alkohol (Äthyl- bzw. Benzylalkohol) wird dann zum Aldehyd dehydriert.

---

[31] Jl. Biol. Chem. Bd. **14**, S. 423 (1913) u. zw. S. 427.
[32] M. Bd. **21**, S. 1079 (1900).
[33] Bioch. Zs. Bd. **26**, S. 199 (1910).
[34] Bei der Oxydation mit frisch gefälltem $Ag_2O$ bei 70—100° entsteht nur Benzoesäure und $CO_2$. Ebenso verhält sich HgO. Bei Einwirkung von Kaliumpermanganat in der Kälte entsteht bei Abwesenheit von Alkali nur Benzoesäure und $CO_2$. (Beilstein Bd. **7**, S. 760—61.
Bei der Einwirkung von $H_2O_2$ auf Phenylglyoxal habe ich ebenfalls Benzoesäure erhalten.

2. Primär findet Dehydrierung zur Ketosäure (Brenztraubenbzw. Phenylglyoxylsäure) statt, an die sich die Dekarboxylierung anschliesst.

Im Falle 1 müsste der Alkohol als Zwischenprodukt mindestens ebenso leicht und vollständig unter den gewählten Versuchsbedingungen in Aldehyd überführbar sein wie die Oxysäure. Zur experimentellen Prüfung unterwarf ich an Stelle des zu leicht flüchtigen Äthylalkohols den Benzylalkohol der Einwirkung des Permanganats. Das Oxydationsmittel wurde nur äusserst langsam verbraucht. Nach beendeter Destillation konnte nicht einmal ein Sechstel des erwarteten Benzaldehyds gefunden werden. Der Alkohol kommt somit als Reaktionszwischenprodukt nicht in Betracht. Im Falle 2 müsste die α-Ketosäure unter den Bedingungen der Oxysäurebestimmungen quantitativ in Aldehyd und Kohlensäure zerfallen. Das trifft aber auch nicht zu. Destilliert man z. B. Brenztraubensäure so wird reichlich und schnell $KMnO_4$ verbraucht, man findet aber nur Spuren von Aldehyd. Die Hauptmenge findet sich als Essigsäure im Destillat wieder. Ebenso verhält sich Benzoylameisensäure, hier können nur etwa 7 % der zu erwartenden Benzaldehydmenge nachgewiesen werden. Ich schliesse, dass keine der erörterten Annahmen zutrifft und dass es überhaupt nicht möglich ist die Reaktion formelmässig in der angegebenen Weise zu zergliedern. Dehydrierung und Dekarboxylierung verlaufen gleichzeitig und sind untrennbar miteinander verknüpft. Versucht man trotzdem den Reaktionsverlauf durch Annahme von Zwischenprodukten zu erklären, so hat man zu berücksichtigen, dass als erste Phase die Abspaltung von Kohlensäure deshalb wenig wahrscheinlich ist, da sie ohne Zusatz des Oxydationsmittels unter den eingehaltenen Bedingungen nicht stattfindet. Man wird daher der Annahme den Vorzug zu geben haben, dass zunächst Dehydrierung der CHOH-Gruppe eintritt,[35] dass aber dabei nicht sofort die beständige und in anderer Richtung reagierende Ketosäure entsteht, sondern ein energiereicheres isomeres Produkt, das leicht in Kohlensäure und Aldehyd zerfällt. Es ist wohl auch denkbar, dass die Reaktion durch partielle Dehydrierung z. B. nur der alkoholischen OH-Gruppe eingeleitet wird, an die sich die Kohlensäureabspaltung und der zweite Teil der Dehydrierung anschliessen.

---

[35] In der Kälte und in neutraler Lösung entsteht aus Milchsäure und Kaliumpermanganat nach F. Beilstein und E. Wiegand (Chem. Ber. Bd. 17, S. 840 (1884) in der Tat Brenztraubensäure).

## c) Tierische Glyoxalasen.

Für den Vergleich von optisch aktiver und gesamter Mandelsäure stand mir zunächst eine Reihe von Ätherextrakten zur Verfügung, die aus der Untersuchung von R. Kuhn und R. Heckscher[36] stammten.

Es ergab sich, dass bei Anwendung von frischen Auszügen aus Schweinsleber unter verschiedenen Bedingungen d (—) und dl-Mandelsäure immer in sehr angenähert gleichen Mengen auftreten. Es werden für jedes Mol (+) Mandelsäure annähernd drei Mole (—) Mandelsäure gebildet. Dieses Verhältnis ist jedoch für Glyoxalasen verschiedener Herkunft nicht dasselbe. Z.B. lieferte ein Auszug aus Schweinefleisch auf 1 Mol (+) Säure nur 2 Mole (—) Säure. Durch Bestimmung der Gesamtmandelsäure neben der optisch aktiven Komponente lässt sich entscheiden, ob die Hemmung des Enzyms, wie sie z.B. durch Pankreas- und Insulinpräparate nach der optischen Methode beobachtet wird, auf einer Beeinflussung der stereochemischen Spezifität des Enzyms bei gleichbleibender Ausbeute an gesamter Oxysäure beruht oder ob es sich um eine gleichmässige Herabsetzung der Bildung von d- und l-Mandelsäure handelt. Dass bei Zusatz von Pankreaspräparaten nicht einfach an Stelle der optisch aktiven racemische Mandelsäure auftritt, sondern dass überhaupt weniger Säure gebildet wird, geht schon aus Aciditätsbestimmungen von Dakin und Dudley hervor. In wieweit aber das Verhältnis der optischen Antipoden dabei unverändert bleibt, lässt sich aus den angeführten Zahlen nicht ersehen. Meine in der Tabelle V zusammengestellten Versuche lassen erkennen, dass in allen untersuchten Fällen die hemmende Wirkung von Pankreas- und Insulinpräparaten sich gleichmässig auf beide Formen der Mandelsäure erstreckt. Die stereochemische Spezifität des Enzyms wird durch die genannten Zusätze nicht beeinflusst.

## d) Pflanzliche Glyoxalasen.

### 1. Erbsenglyoxalase.

Die durch die Wirkung der Ketoaldehydmutase gebildete Mandelsäure ist linksdrehend. Sie ist jedoch durch racemische Säure verunreinigt. Für die von mir untersuchte Erbsensorte war das Verhältnis von optisch aktiver zu Gesamtsäure etwa 40 % und ist nach den Daten meiner Aktivitäts-pH-Kurve-pH abhängig. Es ist jedoch nicht völlig ausgeschlossen, dass diese Erscheinung auf OH-Ionen-Katalyse zurückzuführen ist, da gerade im

[36] H.S. Bd. 160, S. 116 (1926).

alkalischen Gebiet die optische Reinheit mit steigendem pH stark abnimmt. Jedenfalls gibt es keinen Fall in der Enzymchemie, in welchem ähnliches konstatiert worden wäre. Leberesterasen vermögen nach Untersuchungen von H. D. Dakin[37] bei dem Methyl-, Äthyl-, Isoamyl- und Benzylester der dl-Mandelsäure die d-Komponente rascher zu hydrolysieren als die l-Komponente, so dass sich linksdrehender Ester im Reaktionsgemisch anreichert. Nach einer Untersuchung von E. Bamann[38] ist das Verhältnis der Verseifungsgeschwindigkeiten der entsprechenden Mandelsäureester nicht pH-abhängig. Die unter den im experimentellen Teil beschriebenen Bedingungen nur in geringer Ausbeute in Lösung gehende Erbsenglyoxalase vermag nur dl-Mandelsäure zu bilden. In Analogie hiezu findet Binder Kotrba, dass die durch Erbsensaft und die durch das Alkohol gefällte Ferment gebildete Mandelsäure nicht mehr optisch rein ist, sondern dass auch racemische Säure gebildet wird. Das Verhältnis optisch aktiver zu Gesamtmandelsäure beträgt nicht mehr 100% sondern 72,5%.

**2. Grünmalz.**

Für die Untersuchungen mit Grünmalz verwendete ich nur Autolysate. Die von den Malzautolysaten gebildete Mandelsäure ist optisch nicht rein. Das Verhältnis von optisch aktiver zu gesamter Mandelsäure ist auch hier schwankend und beträgt im Mittel 64%.

**3. Hefeglyoxalase.**

Die von Frischhefen gebildete Mandelsäure ist optisch aktiv und zwar linksdrehend. Sie hat eine ähnliche Zusammensetzung wie durch Leberenzym gebildete, das Verhältnis von aktiver zu gesamter Mandelsäure beträgt durchschnittlich etwas über 60%. Doch ist dieses Verhältnis nicht immer dasselbe, es kommen ziemlich grosse Abweichungen vor. Eine Basthefe lieferte fast reine Mandelsäure, das Verhältnis optisch aktiver zu gesamter Mandelsäure beträgt 81%. Es kommen also auf ein 1 Mol l (+) Mandelsäure ca. 9 Mole d (—) Mandelsäure. Bei einer Hefe der Sinner-Aktiengesellschaft betrug das Verhältnis 37%. Dies entspricht 2,6 Molen d (—) auf 1 Mol l (+) Mandelsäure.

Mit gärender Hefe von der Hürlimann-Brauerei, Zürich, wurde optisch reine d (—) Mandelsäure erhalten. Neuberg fand, dass

---

[37] Jl. of Physiol. Bd. **30**, S. 253 (1904); Bd. **32**, S. 199 (1905).
[38] Private Mitteilung.

gärende Hefe Methylglyoxal in reine linksdrehende Milchsäure[39] verwandelt. Während also die Hefen- und die Leberglyoxalase sowohl Methyl- als auch Phenylglyoxal asymmetrisch dismutiert, vermag die Erbsenglyoxalase nur Phenylglyoxal in aktive Säure umzulagern. Genau gleiche Verhältnisse finden wir bei den Bakterien: Lactobazillus S 48$a_3$ vermag zwar optisch reine l- (+) Mandelsäure zu bilden, liefert aber nur dl-Milchsäure. Es ist also für die enzymatische Beschleunigung der inneren Cannizzaroreaktion durchaus nicht gleichgültig, ob das Glyoxal durch Methyl- oder Phenyl- substituiert ist.

Hefeautolysate: Das in Lösung gehende Enzym der Hefen liefert ebenfalls linksdrehende Mandelsäure, die aber im Gegensatz zu der durch Frischhefeenzym gelieferten in den meisten Fällen optisch rein ist. Es ist also durch den Lösungsvorgang eine Änderung der Spezifität des Enzyms eingetreten. Dies ist eine Beobachtung zu der es in der Literatur keinen Analogiefall gibt. Binder Kotrba findet in Übereinstimmung mit mir, dass die durch in Lösung befindliche Erbsenglyoxalase gebildete Mandelsäure ebenfalls eine andere Zusammensetzung hat als die durch das Enzym der Frischerbse gelieferte. Doch liegen hier die Verhältnisse umgekehrt, die durch Erbsenautolysate gebildete Mandelsäure wird optisch unreiner.

Bei Kinetiken der Mandelsäurebildung durch Hefeketoaldehydmutase schien die Säure mit wachsender Versuchsdauer optisch unreiner zu werden. Doch stellte es sich bei genauerer Analyse der sich ergebenden Kurven für Gesamt- und aktive Oxysäure heraus, dass dieser Effekt auf unspezifische Dismutation des Phenylglyoxals durch OH-Ionen zurückzuführen ist. Durch Kontrollversuche sind solche Irrtümer auszuschliessen.

## III. Charakterisierung der Hefeglyoxalasen.

Ausser der Feststellung der Tatsache, dass die Hefe Ketoaldehydmutase enthält, ist über dieses Enzym noch nichts bekannt geworden. Für meine reaktionskinetischen Messungen verwendete ich meist Hefeautolysate von Basthefe Nürnberg. Das pH-Optimum für die Phenylglyoxaldismutation liegt bei pH 6 (elektrometrisch gemessen) und fällt nach beiden Seiten gleichmässig ab. Bei pH 4,57 einerseits und pH 7,31 andererseits konnte nur noch geringe Mandelsäurebildung festgestellt werden.[40] Für die Phenyl-

[39] Bioch. Zs. Bd. 182, S. 470 (1927). Bac. Delbrücki liefert inakt. Milchsäure, dag. 82-prozentige l- (+) Mandels. Ähnlichen Verhältnissen begegnen wir beim B. lactis aerogenes. (Bioch. Zs. Bd. 186. S. 331, (1927).

[40] Bei pH 9 war keine Enzymwirkung mehr zu beobachten.

glyoxalase der Schweineleber finden R. Kuhn und R. Heckscher[41] pH 8 optimal. C. Neuberg[42] hat mit lebender Hefe ohne pH regulierenden Bodenkörper gefunden, dass die Methylglyoxaldismutation noch bei pH 3,7 zu Ende geht. Vermutlich ist das Enzym in der Zelle weniger empfindlich gegen grosse H-Ionenkonzentration als in Lösung, oder für die Milch- bezw. Mandelsäurebildung durch Hefeglyoxalase sind die optimalen H-Zahlen verschieden, wie dies nach R. Kuhn und R. Heckscher[43] für die Schweineleberglyoxalase der Fall ist. Das Milchsäurebildungsoptimum liegt bei pH 7,5, das für Mandelsäure bei pH 8—9. Nach R. Kuhn und R. Heckscher müssen die Unterschiede der pH-Kurven nicht im Sinne einer Verschiedenheit von Methyl- und Phenylglyoxalase gedeutet werden: . . „es könnte das Ergebnis ähnlich wie bei der Einwirkung der β-Glukosidase des Emulsins auf verschiedene β-Glukoside von der Art des Substrates abhängen auch ohne dass dieses entschieden sauere oder basische Eigenschaften aufweist."[44]

Wie R. Kuhn und R. Heckscher für die tierische, so finde ich auch für die Hefeglyoxalase zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit direkte Proportionalität, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit als Mass für die vorhandene Enzymmenge gelten kann.

Das Temperaturoptimum der Phenylglyoxaldismutation für Bastautolysat liegt bei pH 6,4, einer Versuchsdauer von 24 Stunden und einer Phenylglyoxalkonzentration von 300 mg in 45 ccm Reaktionsvolumen, in der Nähe von 30°. Bei 40° ist die Reaktionsgeschwindigkeit natürlich grösser, jedoch wird nur ein geringer Umsatz erzielt, da nach kurzer Zeit Flockung der Enzymlösung eintritt.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist stark abhängig von der Substratkonzentration. Während nach R. Kuhn und R. Heckscher[45] bei der Leberglyoxalase mit steigender Substratkonzentration die Menge der gebildeten Mandelsäure zunimmt, finde ich für Glyoxalase aus Hefeautolysat ein Optimum des Umsatzes, welches für Basthefeautolysat bei einer Substratkonzentration von 200 mg Phenylglyoxalhydrat auf 45 ccm Reaktionsvolumen liegt. Steigt die angewandte Phenylglyoxalmenge, so tritt Flockung in der Enzymlösung ein. Während von 10 ccm Autolysat entsprechend 5 g Frischhefe von 200 mg Ketoaldehyd 31,9 % dismutiert wurden,

---

[41] H. S. Bd. **160**, S. 151 (1926). Vergl. auch R. Heckscher, Über enzymatische Milchsäurebildung, Inaugural-Diss. München 1927.
[42] Bioch. Zs. Bd. 182 (1927) u. zw. Seite 472.
[43] und [44] H. S. Bd. **160**, S. 119 u. 120.
[45] H. S. Bd. **160**, S. 120 u. 121 (1926).

betrug der Umsatz bei 1,2g Hydrat und derselben Menge Autolysat nur noch 0,9%. Bei der Lebermethylglyoxalase ist der in der Zeiteinheit erzielte Umsatz bis herunter zu 0,005n Lösungen von der Menge des angewandten Substrates unabhängig.[46] Der Unterschied in der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Leber- und Hefeglyoxalase von der Phenylglyoxalkonzentration ist auf die verschiedene Ausflockbarkeit der kolloiden Träger des Enzyms zurückzuführen.

Die intramolekulare Dismutation des Phenylglyoxals durch Hefeautolysate verläuft nicht vollständig. Während die unter Anwendung von Bakterien und Phenylglyoxal erzielten Umsätze 100% betragen,[47] werden durch Leber- und Hefeglyoxalase höchstens 50% der möglichen Menge Mandelsäure gebildet. Dies ist jedoch nicht darauf zurückzuführen, dass zwischen Mandelsäure und Phenylglyoxalhydrat sich ein reversibles Gleichgewicht einstellt. Versuche mit inaktiver Mandelsäure und Hefeglyoxalase haben keine Aktivierung der Säure und auch keine Bildung von Phenylglyoxal ergeben. Dies steht in Übereinstimmung mit den von R. Kuhn und R. Heckscher gemachten Angaben, die ebenfalls eine Reversibilität Phenylglyoxal $\rightleftharpoons$ Mandelsäure ausschliessen.[48]

Die enzymatische Disproportionierung des Phenylglyoxals scheint nach den meisten der vorliegenden Versuchsresultate nicht dem Zeitgesetz erster Ordnung zu gehorchen. Die für eine monomolekulare Reaktion berechneten Konstanten fallen stark ab, was sicher zum Teil auf Enzymzerstörung zurückgeführt werden kann. Doch errechnen sich aus einer der ausgeführten Kinetiken, die bei optimaler H-Ionenkonzentration durchgeführt wurde, für die ersten Punkte nach der Formel für monomolekulare Reaktion drei konstante Werte, so dass wahrscheinlich wird, dass die Phenylglyoxaldismutation monomolekular verläuft.[49]

## IV. Zur Theorie der Glyoxalasewirkung.

Aus der Summe der vorliegenden Arbeiten und der meinigen geht hervor, dass die Ketoaldehydmutasen aus dem inaktiven Material Phenylglyoxalhydrat die beiden optischen Antipoden der Mandelsäure zu bilden vermögen, aber auch die verschiedensten

[46] H. S. Bd. **160**, S. 120 u. 121.

[47] C. Neuberg u. E. Simon Bioch. Zs. Bd. 186, S. 331 (1927). Ebenso vollständig verläuft die Methylglyoxaldismutation mit Leber- und Hefenenzym. (C. Neuberg u. M. Kobel Bioch. Zs. Bd. 182, S. 470 1927).

[48] R. Kuhn und R. Heckscher H. S. Bd. **160**, (1926) u. zw. S. 122.

[49] Vergl. hiezu auch R. Kuhn und R. Heckscher H. S. Bd. 160 (1926) S. 143.

Verhältnisse optisch aktiver zu Gesamtmandelsäure auftreten können. Es drängt sich die Frage auf, ob wir es hier mit den Wirkungen eines einzigen Fermentes zu tun haben oder ob mehrere Fermente zur Erklärung dieser Tatsachen angenommen werden müssen.

Die Oxynitrilsynthese Benzaldehyd-Blausäure kann durch Emulsinpräparate asymmetrisch beschleunigt werden und zwar so, dass einmal rechtsdrehendes d-Mandelsäurenitril[50], ein andermal linksdrehendes Oxynitril gebildet wird.[51] Durch Verseifung erhält man dann d- (—) bzw. l- (+) Mandelsäure. Das Emulsin beschleunigt aber auch die Bildung racemischen Oxynitrils. Hier komplizieren sich die Verhältnisse noch dadurch, dass die Emulsinpräparate auch die Spaltung von dl-Oxynitril asymmetrisch und symmetrisch beschleunigen können. Rosenthaler hat für diese Leistungen verschiedene Enzyme angenommen, doch konnte E. Nordefeldt[52] sämtliche symmetrisch kinetischen Wirkungen ohne Einführung besonderer Hypothesen als Aciditätswirkungen erklären.

Im Falle der Glyoxalasewirkung ist es nicht möglich die Bildung racemischer Mandelsäure neben optisch aktiver auf OH-Ionen-Katalyse zurückzuführen, da racemische Säure auch dann entsteht, wenn die H-Ionenkonzentration grösser wie $10^{-7}$ ist.

Für die Erklärung der enzymatischen Erscheinungen bei der Ketoaldehydmutase gibt es verschiedene Möglichkeiten.

1. H. D. Dakin und H. W. Dudley[53] neigen zu der Ansicht, dass die optischen Verhältnisse der gebildeten Mandelsäure durch die Annahme zweier Enzyme von verschiedener Stabilität erklärt werden können, von denen das eine die Bildung rechtsdrehender Mandelsäure besorgt, während dem andern die Bildung der l-Konfiguration der Mandelsäure zukäme. Die Verteilung dieser zwei Enzyme wäre dann in den einzelnen Ausgangsmaterialien verschieden. Sie könnten zusammen vorkommen, entweder in gleichen oder in ungleichen Mengen oder auch einzeln, wodurch die Bildung racemischer Mandelsäure, der Gemische von racemischer und aktiver, sowie die Bildung optisch reiner Formen der Mandelsäure erklärt würde. Es müsste möglich sein, diese beiden Enzyme aus ihrer Mischung zu trennen so, dass eine

[50] L. Rosenthaler. Durch Enzyme bewirkte asymmetr. Synthesen. Bioch. Zs. Bd. 14, S. 238 (1908); Bd. 17, S. 257 (1909).

[51] K. Krieble. Asymmetric syntheses through the action of oxynitrilases. Cit. nach Oppenheimer-Kuhn: Die Fermente und ihre Wirkungen 5. Aufl. S. 223.

[52] Bioch. Zs. Bd. 137, S. 489 (1923).

[53] Jl. Biol. Chem. Bd. 14, S. 423 (1913) u. zw. S. 525.

Enzymlösung, die ursprünglich eine racemische Säure lieferte, in eine linksdrehende säurebildende und eine rechtsdrehende Säure liefernde Komponente zerlegt werden könnte. Hierfür gibt es aber noch keine Anzeichen. Nach meinen Versuchen ist das aus der Adsorption an $Al(OH)_3C_\gamma$ durch Elution erhaltene Leberenzym nicht anders zusammengesetzt, wie das in der Mutterlauge zurückbleibende, da durch beide neben optisch aktiver d- (—) Mandelsäure racemische gebildet wird, obschon beide gegenüber der Rohenzymlösung optisch reinere Oxysäuren liefern. Die Tatsache, dass Frischhefe neben aktiver, racemische Säure bildet, das Autolysat aber optisch reine, kann so erklärt werden, dass die zwei Enzyme verschieden schwer in Lösung gehen. Es kann aber nicht erklärt werden, dass hohe Erfurter Zuckererbsen im frischen Zustande optisch reine, das in Lösung gehende Enzym dagegen neben aktiver racemische Mandelsäure bildet.

2. Emil Fischer schreibt die asymmetrische Wirkung von Enzymen auf inaktive Substrate dem asymmetrischen Bau der katalytisch wirksamen Enzymgruppe zu. Nimmt man nun mit C. Neuberg und P. Mayer an, dass das Methyl- beziehungsweise Phenylglyoxal durch innere Halbacetalbildung, welche durch das Enzym bewirkt sein soll, ein asymmetrisches C-Atom erhält, so würden durch die Anlagerung des Enzyms stereoisomere Körper entstehen, die verschieden schnell in Oxysäure und Enzym zerfallen könnten. Hierzu gibt es nicht nur ein schönes enzymatisches Beispiel, nämlich die verschieden schnelle Verseifung der Antipoden der Mandelsäureester durch Leberlipase,[54] sondern auch nichtenzymatische Modelle. So konnten G. Bredig und K. Fayans[55] die d- und die l-Form der Camphocarbonsäure durch Zusatz optisch aktiver Basen verschieden schnell in Kohlensäure und Kampfer spalten,[56] so dass je nach dem angewandten Katalysator einmal die d- ein andermal die l-Form bei Anwendung das Racemats sich anreichert. Der Endzustand ist natürlich nicht asymmetrisch, da die ganze Menge, also gleichviel d- und l-Form in Kohlensäure und Kampfer zerfällt. Die Ketoaldehydmutase vermag jedoch die ganze Menge des Substrates in optisch reine z. B. d-(—) Mandelsäure zu verwandeln. Wollte man dennoch die optische Aktivierung auf verschiedene Zerfallsgeschwindigkeiten der Enzymsubstratverbindungen zurückführen, so müsste man annehmen, dass die eine derselben unendlich langsam zerfällt. Eine

[54] H. D. Dakin Jl. of Physiol. Bd. 30, S. 253 (1 904); Bd. 32, S. 199 (1905).
[55] Chem. Ber. Bd. 41, S. 752 (1909).
[56] Optisch inaktive Basen spalten die d- und l-Form der Champhocarbonsäure gleich schnell.

100-prozentige Umlagerung des Phenylglyoxals in eine der Raumformen der Mandelsäure wäre dann folgendermassen zu erklären: Zwischen Phenylglyoxal, dem hypothetischen Racemat und den verschiedenen Raumformen der Enzymsubstratverbindung muss aus energetischen Gründen ein reversibles Gleichgewicht herrschen. Zerfällt nun nur eine der Enzymsubstratverbindungen, so wird diese zur Herstellung des Gleichgewichts auf dem Weg über das Racemat auf Kosten der anderen Verbindung wieder nachgeliefert. Diese Vorstellung ist gut vereinbar mit Erfahrungen, die bei der Überführung von racemischen Verbindungen in optisch aktive Formen durch Kombination mit optisch aktiven Körpern gemacht wurden. W. I. Pope und S. I. Peachy[57] behandelten das Jodid der Methyl-aethyl-propylzinnbase mit molaren Mengen von Silber d-Camphersulfonat. Dabei bildeten sich gleiche Mengen l- und d-Salz. Wurde nun die Lösung des Racemats eingedampft, so fiel die d-Form des Sulfosalzes aus. Bei weiterem Eindampfen erhielt man schliesslich die gesamte ursprünglich vorhandene Menge des racemischen Sulfosalzes in der d-Form.[58] Offenbar muss sich der nach dem Ausfallen des d-Salzes in Lösung befindliche Überschuss der l-Form über die d-Form racemisieren.

Die in diesem Abschnitt versuchte Deutung der Glyoxalasewirkung vermag kaum zu befriedigen, da zur Erklärung der Tatsache, dass die optische Eigenart der enzymatisch gebildeten Oxysäure sich fast mit jedem Enzymmaterial ändert, neue Hilfsvorstellungen notwendig werden.

Man müsste, wenn man an der Einenzymtheorie festhalten wollte, annehmen, dass die Begleitstoffe der Ketoaldehydmutasen die optische Spezifität derselben zu beeinflussen vermögen. Die Spezifität der Enzyme, die strukturchemische, wahrscheinlich auch die stereochemische ist nach R. Willstätter[59] unbeeinflussbar und konstant. „Diese Konfigurationsspezifität kann bis jetzt als eine Enzymkonstante gelten. Man hat noch in keinem Falle einen den Drehungssinn der vorgezogenen Komponente bestimmenden Einfluss von Fremdkörpern beobachtet".[60]

3. Eine andere Möglichkeit der Deutung der Wirkung der Ketoaldehydmutase ist die folgende: Die Glyoxalase ist ein Fer-

---

[57] Proc. Bd. **16**, S. 42 (1900) Centr. Bl. 1900 I S. 654.

[58] Es konnte auf keine Weise die l-Form des Salzes isoliert werden.

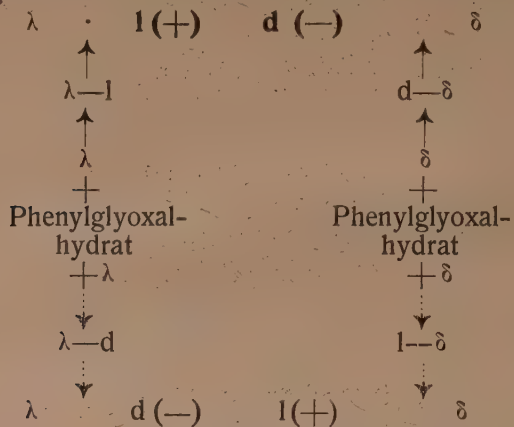
[59] Über neue Methoden der Enzymforschung. Naturw. Heft 42. S. 937 (1926).

[60] Damit stehen die Resultate der in Tab. V mitgeteilten Hemmungsversuche im Einklang.

ment, das aus zwei enandiomorphen Molekülen besteht, einer d- und l-Form. An die d-Form lagere sich das Phenylglyoxalhydrat an, welches dabei so umgewandelt wird, dass beispielsweise die l-(+) Mandelsäure beim Zerfall der Enzymsubstratverbindung entsteht. Die Bildung derjenigen Enzymsubstratverbindung, die unter Zerfall linksdrehende Mandelsäure ergibt, kann dieselbe Raumform des Enzyms aus thermodynamischen Gründen nicht oder nur in geringem Umfang bewirken. Die andere Raumform des Enzyms wäre dann hauptsächlich zur Bildung von d-(—) Mandelsäure befähigt. Die komplizierten optischen Verhältnisse der durch die Wirkung des Enzyms entstehenden Oxysäuren wären dann eine Folge der verschiedenen Verteilung der spiegelbildlich gleichen Formen des Enzyms in den verschiedenen Zellarten.

Folgendes Schema soll den Vorgang der Bildung der racemischen Mandelsäure (allgemeinster Fall) verdeutlichen:

δ sei der eine Antipode des Enzyms, δ—d die eine der Enzymsubstratverbindungen, d (—) die linksdrehende Form der Oxysäure. λ sei der andere Antipode des Enzyms und l (+) die rechtsdrehende Form. λ—l sei die andere der Enzymsubstratverbindungen.




Die im Hinblick auf die beim Lösungsvorgang des Enzyms eintretende Änderung seiner optischen Spezifität der Deutung der Gloxalasewirkung nach den unter 2 und 3 entwickelten Vorstellungen erwachsenden Schwierigkeiten können durch die Annahme überwunden werden, dass die enandiomorphen Formen des Enzyms leicht racemisiert werden können.

Es gibt zahlreiche Beispiele dafür, dass die Racemisierung optisch aktiver Verbindungen, die gewöhnlich durch Erhitzen auf

höhere Temperatur zu erreichen ist, auch spielend leicht, ja spontan eintreten kann. So haben z. B. P. Walden bei den aktiven Halogenbernsteinsäureestern, E. Wedekind bei aktiven Ammoniumsalzen und A. Werner bei aktiven Metallkomplexsalzen Autoracemisierung feststellen können. „Die Racemisierungsgeschwindigkeit hängt ab von der chemischen Natur des aktiven Stoffes, von der Natur des optisch inaktiven Lösungsmittels und des Lösungsgenossen (ob Salz, Säure oder Base u. ä.) von der Temperatur, Ionenkonzentration u.ä."[61]

## V. Versuch einer nichtenzymatischen asymmetrischen Katalyse der inneren Cannizzaroreaktion bei Phenylglyoxal.

Es gibt zahlreiche Beispiele, die zeigen, dass die Umlagerung eines symmetrischen oder innerlich kompensierten oder überhaupt inaktiven Stoffes in aktive Formen kein Privileg der Enzyme ist.[62]

So konnten G. Bredig und Fiske[63] je nach der Natur der als Katalysator dienenden optisch aktiven Base die Cyanhydrinsynthese Benzaldehyd-Blausäure entweder zum d-Cyanhydrin- durch Chinin oder zur l-Verbindung mit Chinidin führen. Ja auch bei Metallverbindungen konnte man auf nichtenzymatischem Wege aus inaktivem Material aktive Verbindungen erhalten, wie dies oben am Beispiel der Überführung der Methyl-aethyl-propylzinnbase in die d-Form durch W. J. Pope und S. J. Peachy dargetan wurde.

Ich habe versucht mit Hilfe optisch aktiver Basen wie Nikotin und Codein die Mandelsäurebildung aus Phenylglyoxalhydrat asymmetrisch zu führen. Ich konnte jedoch in keinem Fall die Bildung aktiver Oxysäure nachweisen.

## VI. Phenylglyoxal und gärende Hefe.

Es sollte geprüft werden, ob Phenylglyoxal als Acceptor für Gärungswasserstoff auftreten könne. Ich habe gefunden, dass gärende

---

[61] Vergl. das Kap. Racemisierung, Autoracemisierung in P. Waldens Vortrag: Vergangenheit und Gegenwart der Stereochemie, Naturw. 1925, S. 376.

[62] Vergl. die Ausführungen über dieses Gebiet bei P. Walden l. c. 58 und zwar Seite 379. Ferner die diesbezüglichen Kap. von R. Kuhn in Oppenheimers Handbuch der Fermente.

[63] Durch Katalysatoren bewirkte asymmetrische Synthese (Bioch. Zs. 46, 1912).

Hefe etwa 5% des zugesetzten Substrates durch phytochemische Reduktion[64] in Benzoylkarbinol überführt.

In einer neueren Arbeit von C. Neuberg und M. Kobel wird mitgeteilt, dass Methylglyoxal in gärender Hefe zu 5% zu Propylenglykol reduziert wird. Dieses ist optisch aktiv und zwar linksdrehend.[65] Es ist sehr bemerkenswert, dass die Reduktion im Falle des Methylglyoxals asymmetrisch verläuft und bei einer anderen Reduktionsstufe halt macht wie beim Phenylglyoxal.[66]

Es könnte das Auftreten von Benzoylkarbinol bei der Zugabe von Phenylglyoxal zu gärender Hefe auch anders als durch die Annahme phytochemischer Reduktion erklärt werden. Es ist durchaus denkbar, dass durch die Wirkung der Aldehydmutase, welche die gewöhnliche Cannizzaroreaktion katalysiert,[67] aus Phenylglyoxal einerseits Benzoylkarbinol andererseits Benzoylameisensäure gebildet wird. Ich habe die einzelnen Reaktionslösungen mit Phenylhydrazin auf Benzoylameisensäure geprüft, konnte aber keinen gelben Niederschlag von Benzoylameisensäurephenylhydrazon erhalten. Dennoch wäre es denkbar, dass das Benzoylkarbinol seine Entstehung nicht phytochemischer Reduktion verdankt. Es könnte auch dadurch entstanden sein, dass mit einem der Intermediärprodukte der stattfindenden alkoholischen Gärung z.B. mit Methylglyoxal das Phenylglyoxal kombiniert dismutiert wird, so dass einerseits Brenztraubensäure andererseits Benzoylkarbinol resultieren würde. Doch ist eine solche Reaktion von vornherein unwahrscheinlich.

# VII. Beschreibung der Versuche.

## *A. Präparativer Teil.*

## a) Darstellung des Substrates.

Das Phenylglyoxalhydrat wurde nach den Angaben von H. Müller und H. v. Pechmann[68] dargestellt; Isonitrosoacetophenon

---

[64] Die phytochemische Reduktion wurde erstmalig beobachtet von C. J. Lindner und H. J. von Liebig H. S. Bd. 72, S. 449 (1911) am Beispiel des Furfurols.

[65] Bioch. Zs. Bd. 182, S. 472 (1927).

[66] Erst nach Abschluss dieser Versuche erhielt ich Kenntnis davon, dass H. D. Dakin das Schicksal des Phenylglyoxals in gärender Hefe untersucht hat. Er konnte neben linksdrehender Mandelsäure und Benzoylkarbinol Benzaldehyd, Phenylbrenztraubensäure und Benzylalkohol nachweisen. (Jl. biol. Chem. Bd. 18, S. 91–93 [1914] Zentral. Bl. $II_1$, S. 581 [1914].)

[67] Vergl. hiezu J. Pharnas, Bioch. Zs. Bd. 28, S. 274 (1910), ferner F. Batelli und L. Stern Bioch. Zs. Bd. 29, S. 130 (1910.)

[68] Chem. Ber. Bd. 20, S. 2904 (1887) Bd. 22, S. 2556 (1889).

nach der Vorschrift von L. Claisen u. O. Manasse[69] aus Adcotehenon mit Isoamylnitrit und Natriumalkoholat gewonnen wird mit einer 35-prozentigen Natriumbisulfit-Lösung kondensiert und die rein weisse Bisulfitverbindung mit 17-prozentiger Schwefelsäure verkocht. Bei den Ansätzen ging ich aus von 1—2 Molen Acetophenon. Grössere Mengen Ausgangsmaterial anzuwenden ist nicht ratsam, weil unter Umständen das entstehende Isonitrosoacetophenonnatrium schmierig und sehr von nicht umgesetztem Acetophenon verunreinigt, ausfällt. Hierdurch ist das Filtrieren erschwert und es wird nur eine schlechte Ausbeute erzielt. Das rotgelbe Isonitrosoacetophenonnatrium wird staubtrocken in möglichst wenig Eiswasser gelöst und nach dem Abfiltrieren von etwas ungelöst bleibendem, schmierigem Nebenprodukt, die klare rote Lösung unter kräftigem Turbinieren tropfenweise mit der zur Zersetzung notwendigen theoretischen Menge Eisessig versetzt. Die freie Isontirosoverbindung fällt dann in gut filtrierbaren, hellgelben Flocken aus, die nach dem Trocknen nur mehr schwach gefärbt sind. Gibt man jedoch den Eisessig zu schnell zu ohne zu rühren, so schliesst das ausfallende Produkt unverändertes Natriumsalz ein und ist schlecht zu filtrieren und zu trocknen. Für die Weiterverarbeitung zur Bisulfitverbindung wurde das Isonitrosoacetophenon nicht mehr umkristallisiert. Bei der nun folgenden Kondensation mit reinstem Bisulfit Kahlbaum,[70] wobei sich das Reaktionsgemisch stark erwärmt und vorübergehend eine klare Lösung entsteht, konnte ich stets Blausäureentwicklung feststellen, weshalb man am besten unter dem Abzug arbeitet. Nach der Vorschrift von v. Pechmann wird nahe dem Erstarren des Reaktionsgemisches der Kristallkuchen mit etwas Eisessig und viel Alkohol zu einem dünnen Brei angerührt und dann abgesaugt. Wird nun weiter mit 17-prozentiger Schwefelsäure verkocht, so fällt schon in der Wärme neben Benzoesäure die von Pinner beschriebene Benzoyl-phenyl-glyoxalin-N-sulfosäure aus. Nach dem Abfiltrieren dieser Nebenprodukte kristallisiert in der Kälte das Phenylglyoxalhydrat aus, gefärbt und stark verunreinigt durch ein mehr oder weniger gelbrot gefärbtes Öl.

Ich habe versucht diese unbequemen Nebenprodukte bei der Substratgewinnung zu vermeiden und bin auf folgende Weise zum Ziel gelangt: Der bei der Bisulfitkondensation erhaltene Kristallkuchen wurde scharf abgesaugt und Filtrat und Rückstand

---

[69] Chem. Ber. Bd. 20, S. 656; 2194 (1887).

[70] Vergl. hiezu A. Pinner Chem. Ber. Bd. 35, S. 4131 (1902) ferner 38, S. 1531 (1905).

genau wie von Pechmann beschrieben weiter verarbeitet. Man erhält so zwei verschiedene Kristallfraktionen, die gleichfalls mit 17-prozentiger Schwefelsäure verkocht werden. Dabei zeigt es sich, dass die aus der Mutterlauge des Kristallkuchens erhaltene Fraktion schön kristallisierendes, schwach gelb gefärbtes Phenylglyoxal liefert, dagegen die andere Fraktion, die bei der Aufarbeitung des Kristallkuchens selbst erhalten wird, sämtliche verunreinigenden Nebenprodukte aber kein Phenylglyoxal enthält.

Ich gebe hier die Ausbeuten eines Ansatzes mit 2 Mol Acetophenon wieder: 240g Acetophenon → 275 g Isonitrosoacetophenonnatrium = 80,4 % d. Theorie → 150 g Bisulfitverbindung = 42,3 % der Theorie → 19,3g Phenylglyoxalhydrat = 37,5 % der Theorie.

Die bei der Phenylglyoxaldarstellung auftretende Sulfosäure ist von Pinner in ihrer Konstitution aufgeklärt worden. Ob jedoch das beim Verkochen der Bisulfitverbindung nach der ursprünglichen Vorschrift mit dem Phenylglyoxal auftretende gelbrote Öl eine definierte Verbindung sei, war nicht bekannt. Ich habe die beim Abfiltrieren des Kristallkuchens der Bisulfitkondensation auf der Nutsche bleibende Substanz in der von Pechmann angegebenen Weise verkocht, die gebildete Glyoxalinsulfosäure und Benzoesäure abfiltriert und das beim Erkalten sich ausscheidende Öl in Äther aufgenommen. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und das zurückbleibende Öl mehrere Stunden auf dem Wasserbad belassen. Über Nacht kristallisierte die Substanz durch. Der Kristallbrei wurde vom Syrup, der immer wieder durchkristallisierte, abgesaugt. Der Körper löste sich spielend in Wasser, Aether, Alkohol usw. Aus Ligroin Siedep. 30—50°, worin er sehr schwer löslich war, liess er sich umkristallisieren. Er fiel aus in langen weissen Nadeln. Nach mehrmaligem Umkristallisieren zeigte er den Schmelzpunkt 65°. Der Körper reduzierte Permanganat in alkalischer Lösung, erwies sich als eine Säure, gab mit Hydrazin eine gelbgefärbte Verbindung ebenso mit Phenylhydrazin. Diese beiden Verbindungen wurden rein dargestellt, ebenso ein Silbersalz der Säure, da sie sich als hygroskopisch erwies. Die Hydrazinverbindung wurde mehrere Male aus Alkohol umkristallisiert und schmolz dann bei 155—156° unter Zersetzung. Die Phenylhydrazinverbindung wird aus 50-prozentiger Essigsäure, besser und ohne Verlust aus hochsiedendem Ligroin mehrere Male umkristallisiert. Schmelzpunkt 147° (unkorrigiert). Wenn man die Säure in thiophenhaltigem Benzol aufnimmt und mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt, tritt eine intensive Rotfärbung auf. Diese Reaktion ist typisch für alle Verbindungen, die eine Keto-

einer Karbonyl- oder Oxogruppe benachbart haben. Also auch charakteristisch für Benzoylameisensäure. Die Eigenschaften der Substanz, ihr Schmelzpunkt und die Analysen ihrer Derivate stimmen nämlich auf Benzoylameisensäure.

Das bei der Phenylglyoxaldarstellung auftretende Öl ist also in der Hauptsache Benzoylameisensäure.

Analyse des Phenylhydrazons:

3,403 mg Substanz: 8,74 mg $CO_2$ 165 mg $H_2O$
$C_{14}H_{12}N_2O_2$ (240). Berechnet C 70,00 H 5,01
Gefunden C 70,05 H 5,43

3,940 mg Substanz: 10,08 mg $CO_2$, 0,82 mg $H_2O$
$C_{14}H_{12}N_2O_2$ (240). Berechnet C 70,00 H 5,01
Gefunden C 69,93 H 5,18

3,794 mg Substanz: p = 719 mm t = 22° V korr. 0,407 ccm
$C_{14}H_{12}N_2O_2$ (240). Berechnet N 11,67
Gefunden N 11,74

3,506 mg Substanz: p = 719 mm t = 24° V korr. 0,381 ccm
$C_{14}H_{12}N_2O_2$ (240). Berechnet N 11,67
Gefunden N 11,82.

Analyse des Silbersalzes der Benzoylameisensäure:

13,851 mg Substanz
$C_8H_5O_3Ag$ (257,02). Berechnet Ag 41,98
Gefunden Ag 41,95

13,052 mg Substanz
$C_8H_5O_3Ag$ (257,02). Berechnet Ag 41,98
Gefunden Ag 41,89.

## b) Kondensationsprodukte des Phenylglyoxals.

1. Kondensation mit Glykokollesterchlorhydrat:

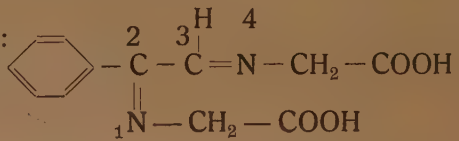
1,5 g Phenylglyoxalhydrat werden in Wasser gelöst mit einer wässrigen Lösung von 3 g Glykokollesterchlorhydrat und der entsprechenden Menge Natriumacetat bei 50° zusammengebracht. Nach einigen Sekunden fallen gelbe Flocken aus. Durch weiteres Erwärmen vermehrt sich der Niederschlag. Dieser wird abfiltriert und getrocknet. Die Substanz löst sich leicht in Benzol, Chloroform, Methyl und Aethylalkohol und ist unlöslich in Petroläther. Der Körper wurde aus absolutem Methylalkohol mehrmals umkristallisiert und schmolz dann bei 198° (unkorr.) zu einer roten, klaren

Die Substanz ist schön hellgelb gefärbt und kristallisiert in dünnen, unregelmässig begrenzten, glänzenden Blättchen.

3,532 mg Substanz p 717 mm, t 27° V korr. 0,384 ccm

$C_{12}H_{12}O_4N_2$ (246,1). Berechnet N 11,38
Gefunden N 11,67.

Konstitution der Verbindung:
Es handelt sich also um 2 Phenyldiazin 1,4 diessigsäure.



Dieser Körper ist in der Literatur noch nicht beschrieben.

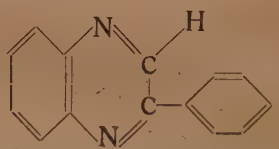
2. Kondensation mit o. Phenylendiamin:

Zwei Gramm Phenylglyoxalhydrat in Wasser gelöst werden mit 3 g o. Phenylendiamin bei mässiger Wärme zusammengegossen. Die Verbindung fällt sofort in gelben Flocken aus, die rasch durchkristallisieren. Sie ist in den gewöhnlichen Lösungsmitteln leicht löslich und kann aus gewöhnlichem Alkohol gut umkristallisiert werden. Nach dreimaligem Umkristallisieren schmilzt die Substanz zwischen 76,5 und 77° (unkorrigiert) zu einer hellgelben klaren Flüssigkeit.

3,654 mg Substanz p 717 mm t 25° V korr. 0,470 ccm

$C_{14}H_{10}N_2$ (206,1). Berechnet N 13,60
Gefunden N 13,90.

Konstitution der Verbindung:
Es ist also 2 Phenyl 1,4 Benzdiazin.



Dieser Körper ist in der Literatur mehrfach beschrieben und erstmals von O. Hinsberg[71] aus Monobromacetophenon und o. Phenylendiamin dargestellt worden. O. Fischer und F. Römer[72] haben das Phenylchinoxalin aus Isonitrosoacetophenon und o. Phenylendiamin gewonnen.

Es sei an dieser Stelle noch mitgeteilt, dass Methylglyoxal und Dioxyaceton unter den obigen Bedingungen keine Kondensation mit o. Phenylendiamin eingeht. Ferner, dass weder Methyl- noch Phenylglyoxal mit Dimedon (Dimethylcyclohexandion) sich zu schwer löslichen Verbindungen kondensieren.

---

[71] A. 292, S. 245.
[72] B. 41 S. 2350 ferner O. Fischer und E. Schinder B. 39, S. 2238.

## *B. Ausführung der Versuche einer nichtenzymatischen asymmetrischen Katalyse der inneren Cannizzaroreaktion.*

a) Phenylglyoxalhydrat und Codein werden in absolutem Methylalkohol gelöst (auf 1 Mol Phenylglyoxal trifft $^1/_2$ Mol Codein) und im Verlauf von 24 Stunden die Lösung öfter polarisiert. Dabei trat keine Änderung des abgelesenen Winkels ein. Auch nach dem Kochen der Lösung war dieser noch derselbe. Sodann wurde Codein mit Phenylglyoxalhydrat zusammengeschmolzen (t=100°), die Schmelze in Wasser gelöst, angesäuert mit Phosphorsäure und ausgeäthert. Die ätherische Lösung war inaktiv.

b) Phenylglyoxalhydrat wird mit l-Nikotin in absolutem Äther[73] gelöst, 0,3 g Ph. Gl. Hydr. + 0,150 g l-Nikotin. Auch hier trifft 1 Mol des Substrates auf $^1/_2$ Mol der aktiven Base. Die Lösung wurde wieder innerhalb 24 Stunden öfter polarisiert. Der abgelesene Winkel blieb konstant. Darauf wurde der ätherischen Lösung durch mehrmaliges Ausschütteln mit verdünnter Schwefelsäure das Alkaloid entzogen. Die ätherische Lösung zeigte darnach keine optische Aktivität.

## *C. Phenylglyoxal und gärende Hefe.*

100 g mit destilliertem Wasser gewaschene Oltenhefe werden zu 1 Liter 10-prozentiger Rohrzuckerlösung von 30° gegeben und angären lassen. Bei lebhafter Gärung wird nun eine Lösung von 5 g Phenylglyoxalhydrat in 200 ccm Wasser dem Gärgemisch im Laufe von 8 Stunden zugetropft, wodurch die Intensität der Gärung nicht abnimmt. Nach 18 Stunden war dieselbe beendet. Die Hefe wurde dann abgesaugt und ausgewaschen. Das klare, gelbliche Filtrat wurde dann mit 25-prozentiger Phosphorsäure angesäuert, wobei keine Trübung der Lösung auftrat. Nun wurde mehrmals ausgeäthert. Zur Isolierung der Mandelsäure wurde die ätherische Lösung, welche stark nach links drehte, mit Sodalösung ausgezogen. Die Sodalösung wurde dann angesäuert und wiederum mit Äther ausgezogen. Die mit entwässertem Natriumsulfat getrocknete Lösung wurde eingedampft, wobei mit gelblich schmieriger Substanz verunreinigt die Mandelsäure auskristallisierte. Sie wurde mit Tierkohle in wässriger Lösung erwärmt und umkristallisiert. Sie schmolz zwischen 132—134° (unkorrigiert). Optisch reine Mandelsäure schmilzt bei 133°.

---

[73] Das Lösungsmittel muss wasserfrei sein, damit keine OH-Ionenkatalyse, die dann natürlich unspezifisch wäre, eintritt.

0,0836 g der trockenen Säure wurden im Messkölbchen auf 10 ccm in Wasser gelöst und im 2 dcm-Rohr polarisiert, wobei ein Winkel $\alpha_D^{20^0}$ von —2,54° abgelesen wurde. Daraus berechnet sich ein $[\alpha]_D^{20^0}$ von 151,92°. Das $[\alpha]_D^{20^0}$ der Mandelsäure beträgt 150°. Es liegt also die reine d- (—) Mandelsäure vor. Die nach dem Ausschütteln mit Soda zurückbleibende Ätherlösung, welche jegliche optische Aktivität verloren hat, wird nach dem Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat verdampft. Der unreine Rückstand wird aus Petroläther umkristallisiert. Man erhält grosse perlmutterglänzende Blättchen, die bei 75° (unkorrigiert) schmelzen. Da ich vermuten konnte, dass Benzoylkarbinol vorlag, kristallisierte ich weiter aus Äther um, wodurch wie in Beilstein III. Auflage Band 3 Seite 132 angegeben, der Schmelzpunkt der Substanz sprunghaft stieg. Die Substanz, die beim Umkristallisieren aus Ligroin ihren Schmelzpunkt nicht mehr änderte, schmolz nun bei 85—86° zu einer wasserklaren Flüssigkeit. Diese Befunde und die Tatsache, dass ammoniakalische Silberlösung reduziert wird (Silberspiegel), liessen mir eine Elementaranalyse der Substanz überflüssig erscheinen.

## *D. Analytischer Teil.*

### a) Jodometrische Bestimmung von Benzaldehyd.

Nach M. Ripper[74] kann Benzaldehyd durch Versetzen mit überschüssiger Bisulfitlösung und Zurücktitrieren des Überschusses mit Jod quantitativ bestimmt werden.

Ich überzeugte mich durch einige Versuche von der Zuverlässigkeit des Verfahrens. Benzaldehyd Kahlbaum wurde dreimal im Vakuum fraktioniert destilliert, wobei ich Kohlensäure durch die Kapillare streichen liess. Vom frisch destillierten Produkt wurden Mengen von etwa 0,1 g wie zur Elementaranalyse in Glaskügelchen aufgesaugt und gewogen. Die Kügelchen wurden in 250 ccm-Erlenmeyerkölbchen unter 40 ccm $\frac{n}{10}$ $NaHSO_3$-Lösung zerdrückt. Man verdünnt etwa mit 10 ccm Wasser, verschliesst den Kolben, schüttelt kräftig bis zur vollständigen Lösung des Aldehyds und lässt 30 Minuten in Eis stehen. Dann wird mit $\frac{n}{10}$ Jodlösung und Stärke als Indikator schnell auf hellblau titriert. Der Titer der Bilsufitlösung wird bei jeder Aldehydbestimmung neu ermittelt,

[74] M. Bd. 21, S. 1079 (1900) und zwar S. 1084. Vergl. auch H. Bucherer und A. Schwalbe, Ber. Chem. Bd. 39, S. 2814 (1906) und zwar S. 2819.

indem man ebensoviel $\frac{n}{10}$ $NaHSO_3$ wie im Hauptversuch verdünnt und ebensolange verschlossen bei $0^0$ stehen lässt. Ein Verbrauch von 1 ccm $\frac{n}{10}$ $NaHSO_3$ entspricht 5,303 mg Benzaldehyd.

Tabelle I.

| Benzaldehyd angew. (g) | 0,1 n $NaHSO_3$ Vorlage (ccm) | 0,1 n Jod Rücktit. ccm | 0,1 n $NaHSO_3$ Verbrauch ccm | Benzaldehyd gef. (g) | Proz. der Theor. |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,1016 | 42,15 | 23,06 | 19,09 | 0,1012 | 99,6 |
| 0,1148 | 42,15 | 20,50 | 21,65 | 0,1148 | 100,0 |

## b) Bestimmung der Mandelsäure.

0,01—0,02 g reiner Mandelsäure vom Schmelzp. $118^0$ (unkorr.) wurden in 300 ccm 1-prozentiger Schwefelsäure gelöst und in einem 500 ccm Fraktionierkolben unter Berücksichtigung der von v. Fürth und Charnass für die quantitative Bestimmung der Milchsäure angegebenen Vorsichtsmassregeln mit $\frac{n}{10}$ $KMnO_4$ in der Siedehitze oxydiert. Aus einem fein ausgezogenen Tropftrichter, der bis nahe an die Oberfläche der gelinde siedenden Flüssigkeit herabreicht, lässt man in dem Masse als Entfärbung stattfindet, die Permanganatlösung zutropfen. Zu Beginn etwa einen Tropfen in der Sekunde. Den mit den Wasserdämpfen übergehenden Benzaldehyd kondensiere ich in einem langen senkrecht absteigenden Kugelkühler. Die mit Bisulfitlösung beschickte eisgekühlte Vorlage hat die beistehend abgebildete Form. Das Kühlrohr reicht bis nahe an den Boden der Vorlage, so dass eine möglichst innige Berührung der Dämpfe mit der Bisulfitlösung gewährleistet wird. Zu Beginn der Destillation wird die Bisulfitlösung mit so viel Wasser verdünnt, dass eben der untere Teil der Vorlage (40—50 ccm) gefüllt ist. Nach beendeter Destillation spült man den Inhalt der Vorlage quantitativ in einen 500—750 ccm-Erlenmeyerkolben über und verfährt im übrigen genau in der für die Benzaldehydbestimmung angegebenen Weise. Ein

Verbrauch von 1 ccm $\frac{n}{10}$ $NaHSO_3$ entspricht theor. 7,605 mg Mandelsäure log f = 0,87110.

Aus den in Tabelle II mitgeteilten Analysen ergibt sich, dass man auf dem beschriebenen Wege durchschnittlich 95,1% der angewandten Menge Mandelsäure findet.

Tabelle II.

| Mandels. angew. (g) | $\frac{n}{10}$ $NaHSO_3$ Vorl. (ccm) | $\frac{n}{10}$ Jod Rücktit. ccm | $\frac{n}{10}$ $NaHSO_3$ Verbrauch ccm | Mandels. gef. (g) | Proz. der Theorie |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,02046 | 15,64 | 13,06 | 2,58 | 0,0196 | 95,9 |
| 0,0511 | 32,38 | 25,93 | 6,45 | 0,0490 | 96,0 |
| 0,0511 | 31,74 | 35,39 | 6,35 | 0,0483 | 94,5 |
| 0,0999 | 32,38 | 20,04 | 12,34 | 0,0939 | 94,0 |
| 0,0999 | 31,96 | 19,48 | 12,48 | 0,0949 | 95,0 |
| 0,0999 | 32,93 | 20,29 | 12,64 | 0,0961 | 96,2 |
| 0,1998 | 40,45 | 15,71 | 24,74 | 0,1882 | 94,2 |

## c) Bestimmung der Milchsäure.

In der für die Mandelsäurebestimmung angewandten Apparatur habe ich reines Zinklactat der Oxydation unterworfen. Die Ausbeuten an Acetaldehyd betrugen durchschnittlich 95,3% der Theorie, in guter Übereinstimmung mit den aus Mandelsäure erzielten Benzaldehydausbeuten. Die Zahlen der Tabelle III stimmen mit der Theorie besser überein als die von O. v. Fürth und D. Charnass, die im Durchschnitt nur 89% der berechneten Acetaldehydmengen erhielten.[75]

Analyse des angewandten Zinklactats:

0,2738 g verloren bei 120° 0,0498 g Wasser. $(C_3H_5O_3)_2Zn\ 3\,H_2O$

Berechnet: $H_2O = 18{,}17\%$

Gefunden $H_2O = 18{,}19\%$.

[75] Bioch. Zs. Bd. 26, S. 199, (1910). S. auch J. Freyka und K. Vsetecka Public. de la Faculté des Sciences de l'univ. Masarik (1925) Chem. Zentr. Bl. 1926 I S. 99.

Tabelle III.

| Milchs. Zn angew. (g) | 0,1 $NaHSO_3$ Vorlage (ccm) | 0,1 n Jod Rücktit. (ccm) | 0,1 n $NaHSO_3$ Verbrauch (ccm) | Milchs. Zn gef. (g) | Proz. der Th. |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,0122 | 3,59 | 2,03 | 1,56 | 0,0116 | 95,1 |
| 0,0122 | 3,56 | 2,00 | 1,56 | 0,0116 | 95,1 |
| 0,0244 | 7,32 | 4,21 | 3,11 | 0,0231 | 95,0 |
| 0,0244 | 14,35 | 11,23 | 3,12 | 0,023 | 95,3 |
| 0,0609 | 14,86 | 7,00 | 7,86 | 0,0585 | 96,0 |
| 0,0609 | 14,79 | 7,00 | 7,79 | 0,0580 | 95,2 |

## d) Zur Frage des Reaktionsmechanismus.

Dass Brenztraubensäure nicht als Zwischenprodukt der Acetaldehydbildung aus Milchsäure in Betracht kommt, geht aus folgenden Versuchen hervor:

0,1766 g Brenztraubensäure wurden genau wie bei der Milchsäurebestimmung der Oxydation mit Permanganat unterworfen. Das $KMnO_4$ wurde wie durch Milchsäure rasch entfärbt. Doch liessen sich von 42,05 ccm vorgelegter 0,1 n $NaHSO_3$-Lösung 41,70 ccm mit Jod zurücktitrieren. Bei quantitativem Zerfall der Brenztraubensäure in Acetaldehyd u. Kohlensäure hätten 40,14 ccm 0,1 n $NaHSO_3$ gebunden werden müssen. Die erhaltene Aldehydmenge beträgt also weniger als 1% der Theorie und liegt innerhalb der Fehlergrenzen der Methode.

Zur Identifizierung der Reaktionsprodukte wurden 2 g Brenztraubensäure in 1-prozentiger Schwefelsäure mit etwa 500 ccm 0,1 n $KMnO_4$ oxydiert und der Kolbeninhalt bis auf wenige ccm abdestilliert. Das Destillat, dessen Menge 750 ccm betrug, wurde nach dem Neutralisieren mit halogenfreier Natronlauge im Vakuum auf 20 ccm eingeengt. Die bräunlichgelbe Lösung wurde mit Tierkohle entfärbt, mit einem starken Überschuss mit Silbernitratlösung versetzt, aufgekocht und filtriert. Beim Erkalten fielen über 0,5 g prachtvolle silberglänzende Nadeln aus, die sich als reines Silberacetat erwiesen.

0,1304 g Substanz gaben 0,0839 g Ag.

$CH_3COOAg$. Berechnet Ag = 64,64%.

Gefunden Ag = 64,34%.

Die leichte Oxydierbarkeit der Brenztraubensäure durch $KMnO_4$ steht in Einklang mit der Einwirkung von HgO,[76] $Ag_2O$,[77] $H_2O_2$,[78] $CrO_3$,[79] auf diese Ketosäure, die gleichfalls zur Bildung von Essigsäure und Kohlensäure führt.

Benzylalkohol wurde zur Aldehydbestimmung wie oben geschildert oxydiert. Das zutropfende Permanganat entfärbte sich nur äusserst langsam.

Angewandte Menge Benzylalkohol: 0,0708 g, Jodverbrauch ccm 0,1 n: 2,00, nach der Theorie zu erwartender Jodverbrauch ccm 0,1 n: 13,11. Es wurde also nur etwas mehr als $^1/_7$ der zu erwartenden Menge in Aldehyd übergeführt.

In gleicher Weise wurde die Aldehydmenge bestimmt, die man bei der Permanganatoxydation von Benzoylameisensäure erhält. Angewandte Menge Benzoylameisensäure: 0,1530 g, Jodverbrauch in 0,1 n ccm: 1,48. Nach der Theorie wären zu erwarten: 20,40 ccm 0,1 n J. L.

Für den Reaktionsmechanismus der Benzaldehydbildung aus Mandelsäure gilt also, was für die Bildung von Acetaldehyd aus Milchsäure gesagt worden ist.

## e) Oxydation von Oxysäuren, Aminosäuren und Zuckern.

Die Methode von O. v. Fürth und D. Charnass, die eine Umkehrung der Cyanhydrinsynthese darstellt, lässt sich nicht zur Bestimmung aller α-Oxysäuren verwenden.

Diesbezügliche Versuche hat schon S. W. Clausen[80] mit Citronensäure, Glukonsäure, Glycerinsäure, Glykolsäure, Äpfelsäure und Weinsäure angestellt. Die Ausbeuten an bisulfitbindender Substanz standen in keinem einfachen stöchiometrischen Verhältnis zur angewandten Menge der Oxysäuren. Die Ursache kann darin liegen, dass die entsprechenden Aldehyde und Ketone entweder überhaupt nicht quantitativ entstehen, oder dass sie nicht flüchtig sind, oder dass sie unter den Versuchsbedingungen weiteren Veränderungen unterliegen. Ich fand bei Anwendung von reiner Weinsäure und Citronensäure Abnahme des Bisulfittiters,

---

[76] W. Oechsner de Coninck, Bull. Acad. roy. Belgique, Bd. 1905, S. 524; Chem. Zentr. Bl. 1906 I S. 449.

[77] F. Beilstein u. E. Wiegand, Chem. Ber. Bd. 17, S. 841 (1884).

[78] A. F. Hollemann, Rec. trav. Chim. Pays-Bas. Bd. 23, S. 169 (1904).

[79] C. Böttinger, Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 188, S. 293 (1877) u. zw. Seite 299.

[80] Jl. Biol. Chem. Bd. 52, S. 263 (1922) u. zw. S. 269 f.

die 0,20 beziehungsweise 0,23 Molen Aldehyd aus einem Mol Säure entsprachen.

Die Natur der bilsulfitbindenden Substanzen ist von mir nicht näher untersucht worden. Die Angabe Clausens, dass 1 Mol Glukose genau $^1/_2$ so viel bisulfitbindende Substanz liefert wie 1 Mol Milchsäure, kann ich nicht bestätigen. In Versuchen mit reinem Traubenzucker, von denen zwei in Tabelle IV mitgeteilt sind, wurde nur etwa $^1/_3$ der angegebenen Ausbeute erzielt. Übereinstimmend mit dem Verhalten der Glukose ist das der Stärke.

Tabelle IV.

| Substanz | Einwage g | 0,1 n $NaHSO_3$ Verbrauch ccm | Aldehyd Millimol gef. | Mole Aldehyd aus 1 Mol Substanz |
|---|---|---|---|---|
| Weinsäure | 0,1392 | 3,86 | 0,193 | 0,20 |
| Citronensäure | 0,1992 | 4,53 | 0,227 | 0,23 |
| Glukose | 0,1083 | 2,12 | 0,095 | 0,16 |
| Glukose | 0,1096 | 1,96 | 0,088 | 0,15 |
| Stärke | 0,1053 | 2,11 | 0,106 | 0,16 |

Von den Aminosäuren, die ich prüfte, entfärbten Glykokoll und Alanin Permanganat überhaupt nicht. Für Tyrosin wurde ein Bisulfitverbrauch entsprechend der Bildung von 0,11 Molen Aldehyd aus 1 Mol Aminosäure gefunden. Nach Clausen liefert Phenylalanin etwas bisulfitbindende Substanz.

Versuche mit Zimtsäure, die dahin zielten, die Oxydation mit $KMnO_4$ für die Bestimmung von Äthylenkörpern nutzbar zu machen, ergaben, dass die Doppelbindung zwar angegriffen wird, doch blieb die Menge an Benzaldehyd weit hinter der berechneten zurück.

## *E. Enzymatischer Teil.*

### a) Ausführung der Bestimmungen.

50 ccm Reaktionsgemisch bestehend aus Enzymlösung, Phenylglyoxal und Puffer werden zur Sistierung der Mandelsäurebildung mit 5 ccm 25-prozentiger Phosphorsäure versetzt, wobei viel Eiweiss ausfällt und die Farbe der Leber- und Muskelauszüge von rotbraun beziehungsweise gelb nach hellgelb umschlägt. Man fügt fein gepulvertes Ammonsulfat bis zur Sättigung (etwa 40 g) zu

und lässt unter zeitweiligem Umschütteln etwa $^1/_2$ Stunde stehen. Dann wird durch Faltenfilter filtriert und dreimal je nach der Menge des Niederschlags mit 10—15 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung aus einer Spritzflasche nachgewaschen. Das Filtrat schüttelt man fünfmal mit insgesamt 75—100 ccm Äther aus. Entstehen dabei Emulsionen was bei Versuchen mit Leber- und Muskelauszügen sehr selten, bei Anwendung von Hefeautolysaten aber in der Regel eintrifft, so kann man versuchen, sie durch Zusatz von etwas Wasser zu beseitigen. Die mit entwässertem Natriumsulfat getrockneten Ätherauszüge werden in 100 ccm Bechergläsern vorsichtig zur Trockene verdampft. Das Natriumsulfat ist viermal mit insgesamt 30 ccm Äther auszulaugen. Die in schönen Rosetten zurückbleibende Mandelsäure, die mitunter durch etwas bräunliches Harz verunreinigt ist (besonders bei Hefeversuchen) wird in 10 ccm Wasser, die man aus einer Pipette zugibt, bei 50—60° gelöst. Man filtriert die nötigenfalls mit einer Spur Kieselgur durchgeschüttelte Lösung und polarisiert im 2 dm Rohr bei Natriumlicht und 20°. Der abgelesene Winkel in Graden dividiert durch 30 ergibt die vorhandene Menge aktiver Mandelsäure in Grammen.[81]

## b) Leerversuche.

1. Dismutation des Phenylglyoxals durch OH-Ionenwirkung. Bei langer Versuchsdauer und einem pH über 7,0 ist die unspezifische Mandelsäurebildung aus Phenylglyoxal nicht unerheblich und muss deshalb in Rechnung gezogen werden.

Aus 250 mg Phenylglyoxalhydrat entstehen bei 42-stündigem Stehen bei 30° und pH 7,5, 6,3 mg Mandelsäure, was einem Bisulfitverbrauch von 0,83 ccm 0,1 n $NaHSO_3$ entspricht.

2. Der Gehalt an aktiver Substanz der Leber- und Muskelauszüge, sowie der Hefeautolysate ist sehr gering, sodass sich für die ermittelten optischen Ausschläge der Enzymversuche meist keine Korrekturen ergeben.

3. Die Leber- und Muskelauszüge, sowie die Hefeautolysate enthalten in wechselnden Mengen Stoffe, die in die Ätherauszüge gehen und bei der Permanganatoxydation zum Teil flüchtige bilsulfitbindende Substanzen liefern. Es handelt sich bei den Aus-

---

[81] Es ist $[\alpha]_D^{20}$ für Mandelsäure $+ 150°$, folglich ergibt sich für den Gehalt der Lösung an aktiver Substanz (für Konzentrationen, bei welchen sich die spez. Drehung praktisch nicht ändert)

$$c = \frac{100 \cdot \alpha}{[\alpha] \cdot l} = \frac{100 \cdot \alpha}{150 \cdot 2} \text{ (für 100 ccm); } \frac{\alpha}{30} \text{ für 10 ccm.}$$

zügen aus tierischen Geweben wahrscheinlich teilweise um Milchsäure, die aus den Kohlehydraten der extrahierten Gewebe gebildet wurde.[82] Dieser Leerverbrauch muss bei den Versuchsdaten berücksichtigt werden.

Beispiele: 75 ccm Leberauszug (wässriger Extrakt 1:4,5), welcher 1500 Minuten bei 30° aufbewahrt und dann wie oben beschrieben aufgearbeitet wurde, verbrauchte —0,63 ccm 0,1n $NaHSO_3$. 25 ccm Hefeautolysat 1500 Minuten bei 30° aufbewahrt und nach der oben gegebenen Vorschrift aufgearbeitet verbrauchen 0,58 ccm 0,1n $NaHSO_3$. 8 ccm Muskelpreßsaft nach 1500 Minuten in gleicher Weise aufgearbeitet verbrauchten bei der Permanganatdestillation 0,37 ccm 0,1n $NaHSO_3$.

## c) Tierische Glyoxalasen.

Die in Tabelle V mitgeteilten Analysen von Gesamtmandelsäure beziehen sich zum Teil auf Versuche der Arbeit von R. Kuhn und R. Heckscher.[83]

Es ergibt sich, dass die prozentische Hemmung bei gesamter und optisch aktiver Mandelsäure (unter Berücksichtigung der durch die Leerversuche sich ergebenden Korrekturen) durch Insulin Pankreaspulver, Hefe und Muskelkochsaft und durch Takadiastase innerhalb der Versuchsfehler übereinstimmt. Die optisch beobachteten Effekte beruhen also nicht auf Änderung der optischen Spezifität des Enzyms durch die genannten Zusätze. Die mangelnde Additivität von Hefe und Leberglyoxalase drückt sich auch in der Zusammensetzung der entstehenden Mandelsäure aus. Diese entspricht nach Versuch 12 Tabelle V sehr nahe der Zusammensetzung, die bei Anwendung des Leberenzyms allein gefunden wurde, (54,5 gegenüber 51% optisch aktiv) während das Hefeenzym allein viel reinere Mandelsäure (74,9%) bildete. Bei gleichzeitiger Einwirkung von Muskelpreßsaft und von wässrigem Leberauszug auf Phenylglyoxal tritt neben der gegenseitigen Hemmung (Versuch 14, 15 und 16) auch prozentisch eine geringfügige Abnahme an aktiver Mandelsäure ein, die aber bei weitem nicht den gesamten Hemmungseffekt zu erklären vermag. Auch wenn man die Gesamtmengen an Mandelsäure vergleicht, wirkt das Gemisch beider Enzyme so, als ob nur Muskelpreßsaft wirksam wäre.

---

[82] Vergl. hiezu G. Gorr und G. Perlmann, Bioch. Zs. Bd. 174 (1926) und zwar Seite 433.

[83] l. c. 45.

Tabelle V.

| Nummer | Enzym aus: | ccm Enzymlös. | Phenylglyoxalhydrat (mg) | Gesamtvol. ccm | pH | Zusatz | Reaktions Dauer (Min) | $\alpha D^{20}$ 2dm-Rohr (°) | (—) Mandels. gef. (mg) | $\frac{n}{10}$ $NaHSO_3$ für 5 ccm | Mandelsäure gef. (korr.) mg | % aktive Mandels. | % Hemm. aktiv | % Hemm. gesamt |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Schweineleber | 75 | 300 | 120 | 7.65 | keiner | 1500 | — 1.09 | 36.3 | 4.27 | 68.2 | 53.2 | — | — |
| 2 | „ | 75 | „ | 120 | 7.65 | 50 Einh. Insulin Lilly | 1500 | — 1.09 | 36.3 | 4.26 | 68.1 | 53.3 | 0 | 0 |
| 3 | „ | 75 | „ | 120 | 7.5 | 50 Einh. Insulin Schering | 1500 | — 0.88 | 29.3 | 3.25 | 51.7 | 56.6 | 19.3 | 24.1 |
| 4 | „ | 75 | „ | 120 | 7.65 | 0.2 g Pankreaspulver | 1500 | — 0.39 | 13.0 | 1.42 | 22.7 | 57.2 | 64.2 | 66.6 |
| 5 | „ | 80 | „ | 110 | 7.5 | keiner | 1200 | — 1.86 | 62.0 | 7.47 | 122.2 | 50.8 | — | — |
| 6 | „ | 80 | „ | 110 | 7.5 | 5 ccm Hefe-kochsaft | 1200 | — 1.68 | 56.0 | 6.76 | 108.0 | 51.9 | 9.7 | 8.6 |
| 7 | „ | 80 | „ | 110 | 7.5 | 10 ccm Muskelkochsaft | 1200 | — 1.54 | 51.3 | 6.50 | 104.7 | 49.0 | 15.8 | 14.2 |
| 8 | „ | 75 | „ | 113 | 8.1 | keiner | 2790 | — 0.78 | 26.0 | 3.19 | 51.0 | 51.0 | — | — |
| 9 | „ | 75 | „ | 113 | 8.1 | 0.2 g Takadiastase | 2790 | — 0.32 | 10.66 | 1.25 | 20.05 | 53.2 | 61.5 | 60.7 |
| 10 | „ | 100 | 385 | 157 | 7.65 | keiner | 1770 | — 1.21 | 40.3 | 4.94 | 79.0 | 51.0 | — | — |
| 11 | „ | 75 | 300 | 119 | 8.1 | „ | 1500 | — 1.09 | 36.3 | 4.27 | 68.2 | 53.2 | — | — |
| 12 | „ | 60 | „ | 95 | 6.47 | „ | 2340 | — 0.43 | 14.3 | 2.70 | 44.2 | 32.4 | — | — |
| 13 | „ | 60 | „ | 95 | 6.50 | „ | 2340 | — 0.45 | 15.0 | 3.03 | 48.4 | 31.02 | — | — |
| 14 | „ | 60 | „ | 95 | 5.57 | „ | 2340 | — 0.67 | 22.3 | 4.40 | 70.3 | 31.7 | — | — |
| 15 | Muskelpreßsaft | 8 | „ | 119 | 8.1 | „ | 1500 | — 1.20 | 40.0 | 5.13 | 82.0 | 48.8 | — | — |
| 16 | 15 + 11 | 83 | „ | 119 | 8.1 | „ | 1500 | — 1.21 | 40.3 | 5.60 | 89.7 | 45.0 | — | — |
| 17 | Hefe | 20 | 385 | 157 | 7.65 | „ | 1770 | — 1.00 | 33.3 | 2.78 | 44.5 | 74.9 | — | — |
| 18 | 17 + 10 | 120 | 385 | 157 | 7.65 | „ | 1770 | — 1.64 | 54.7 | 6.43 | 102.7 | 54.5 | — | — |
| 19 | Schweinefleisch | 80 | 400 | 120 | 7.5 | „ | 1150 | — 0.42 | 14.0 | 2.59 | 41.3 | 33.9 | — | — |

## d) Pflanzliche Glyoxalasen.

1. Kartoffeln. 100 g über Winter gelagerte, stark keimende Kartoffeln wurden in ungeschältem Zustande mit Seesand zu einem dünnen Brei verrieben und mit 100 ccm Wasser unter Zusatz von überschüssigem Toluol 2 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Es trat nur sehr geringe Säurebildung ein. Mit etwas 2-prozentiger Natronlauge wurde gegen hellblaues Lackmuspapier neutralisiert und für den Versuch die durch Zentrifugieren gewonnene hellbräunliche, milchig getrübte Lösung verwendet.

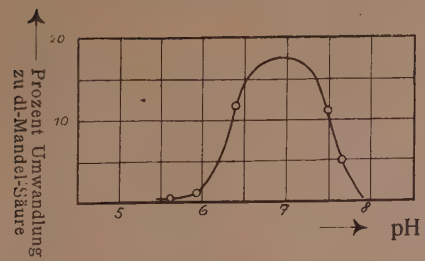
0,3 g Phenylglyoxalhydrat in 10 ccm Wasser gelöst bleiben mit 10 ccm Kartoffelauszug und 30 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer von pH 7,5 24 Stunden bei 30° stehen. Der Rückstand der Ätherauszüge in 10 ccm Wasser gelöst zeigte im 2 dm-Rohr keine optische Aktivität und enthielt auch keine racemische Mandelsäure.

2. Gelbrüben. In genau gleicher Weise wurden Versuche mit frischen gelben Rüben und mit einem bei neutraler Reaktion mit Toluolwasser daraus bereiteten Auszug angestellt. Auf 0,3 g Phenylglyoxalhydrat trafen 10 g frische Rüben beziehungsweise die demselben Gewicht entsprechende Menge Auszug. Nach 24 Stunden konnte weder aktive noch racemische Mandelsäure nachgewiesen werden.

3. Erbsen. Je 10 g grüne Erbsen, frisch der Schote entnommen und 8 Tage gekeimt, wurden mitsamt den Keimlingen mit Seesand fein verrieben und bei wechselndem pH mit 0,3 g Phenylglyoxalhydrat 39 Stunden bei 30° belassen. Im Gesamtvolumen von 45 ccm waren 30 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatgemisch enthalten. Die pH-Werte entsprechen der Zusammensetzung des Puffers, nicht der Acidität der Reaktionsgemische.

Tabelle VI (Fig. 1).

Aktivitäts-pH-Kurve der Erbsenglyoxalase.




| pH | $\alpha_D^{20'}$ | % Umw. zu aktiv. S. |
|---|---|---|
| 7,64 | — 0,46 | 5,1 |
| 7,5 | — 1,00 | 11,1 |
| 6,4 | — 1,03 | 11,4 |
| 5,9 | — 0,10 | 1,1 |
| 5,6 | — 0,04 | 0,4 |

| pH | $\alpha_D^{20}$ i. 2 dm-Rohr | mg d-(—) Mandels. gef. | 5 ccm Lösg. 0,1n $NaHSO_3$ verbr. | mg. Ges. Mandels. gef. | Aktiv. Mandels. % |
|---|---|---|---|---|---|
| 5,6 | —0,04 | 1,3 | — | — | — |
| 5,9 | —0,10 | 3,3 | 0,94 | 7,6 | 43,4 |
| 6,4 | —1,03 | 34,3 | 8,58 | 68,5 | 50,0 |
| 7,5 | —1,00 | 33,3 | 9,42 | 75,2 | 44,3 |
| 75,6 | —0,46 | 15,3 | 10,56 | 84,3 | 18,1 |

Die Wirkungsoptima für die Bildung optisch aktiver und von gesamter Mandelsäure stimmen nach Tabelle VI nicht überein. Im untersuchten Gebiet nimmt mit sinkender Acidität die Gesamtmenge der Oxysäure stetig zu, während für die aktive Säure ein Optimum bei pH 7 besteht. Dadurch wird bedingt, dass bei etwas kleinerem pH als dem Optimum für d-(—) Mandelsäure entspricht ein Maximum des Quotienten aktive Oxysäure dividiert durch gesamte Oxysäure auftritt. Dieser Quotient lässt sich nun nicht nur durch pH-Änderung, sondern auch durch fraktionierte Autolyse der Erbsensamen entscheidend verschieben. Bei zweistündigem Ausziehen mit Toluolwasser geht Enzym in Lösung, das ausschliesslich inaktive Säure bildet. Die beim Eindunsten der Ätherauszüge in prachtvollen Rosetten auskristallisierende Mandelsäure lässt jedwede optische Aktivität vermissen.

### Änderung der optischen Spezifität beim Lösungvorgang der Erbsenglyoxalase.

Je 7 g frische, nicht gekeimte, grüne Erbsen mit Seesand fein zerrieben beziehungsweise die entsprechende Menge Auszug (Darstellung entsprechend den Angaben für Kartoffeln) mit 0,3 g Phenylglyoxalhydrat und 30 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatgemisch von pH 7,5 zu 55 ccm bei 30°. Reaktionsdauer 39 Stunden.

| Enzym | Ph. gl.-hydr. (g) | $\alpha_D^{20}$ 2dm-Rohr (°) | d-(—) Mandels. gef. (mg) | ccm $\frac{n}{10}$ $NaHSO_3$ verbr. | Gesamt-Mandels. gef. | Aktive Mandels. % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Fr. Erbsen 15. V. 26 | 0,3 | —0,36 | 12,0 | 4,06 | 32,4 | 37,0 |
| „ | — | ±0,00 | — | 0,18 | — | — |
| Auszug daraus | 0,3 | ±0,00 | 0,0 | 0,96 | 7,3 | 0,0 |
| „ | — | ±0,00 | — | 0,17 | — | — |
| Fr. Erbsen 22. V. 26 | 0,3 | —0,37 | 12,3 | 3,88 | 30,9 | 39,8 |
| Auszug daraus | 0,3 | ±0,00 | — | 2,10 | 16,7 | — |

4. Grünmalz. Grünmalz der Löwenbrauerei A.-G. wurde mit Sand zerquetscht und mit 5 Teilen Toluolwasser 2 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die filtrierten Lösungen waren meist nur schwach wirksam. Das Verhältnis von aktiver zu gesamter Mandelsäure war, so weit dies bei der Geringfügigkeit der erzielten Umsätze feststellbar ist, recht schwankend und höher als mit Erbsenenzym.

### Prüfung verschiedener Malzauszüge.

Enzymlösung entsprechend je 5 g frischem Grünmalz auf 0,3 g Phenylgloxalhydrat. Bei 7,5 in 45 ccm Gesamtvolumen. Phosphor-Gehalt 30 ccm $\frac{m}{5}$. Einwirkungsdauer 40 Stunden bei 30°. Die aus den Kontrollversuchen ohne Substrat sich ergebenden Korrekturen sind bei allen Zahlen der Tabelle bereits angebracht.

| $\alpha_D^{20}$ 2 dm-Rohr (°) | d-(—) Mandels. gef. (mg) | ccm 0,1 n $NaHSO_3$ verbr. | Gesamt-Mandels. gef. mg | aktive Mandels. % |
|---|---|---|---|---|
| —0,18 | 6,0 | 1,04 | 8,0 | 75 |
| —0,24 | 8,0 | 2,36 | 18,1 | 44 |
| —0,40 | 13,3 | 3,08 | 24,5 | 54 |

5. Champignons. In Champignons fanden wir bei Untersuchung verschiedener Proben vielfach gar kein Enzym, mitunter wurde etwas linksdrehende Mandelsäure ($\alpha_D^{20}$:— 0,12°) gebildet.

Zur Untersuchung dienten sowohl frische mit Sand verriebene Pilze, als auch wässrige Auszüge von Champignons.

## 6. Hefeglyoxalasen.

### a) Herstellung der Autolysate.

Die Autolyse der Hefen wird mit Essigsäureaethylester nach den Angaben von R. Willstätter und E. Bamann[84] für die Darstellung von Maltaselösungen vorgenommen, doch wird mit 2-prozentiger Natronlauge, nicht mit Ammoniak neutralisiert, da dieses mit Phenylglyoxal unter Glyoxalinbildung reagiert.

Die folgenden reaktionskinetischen Messungen sind meist mit Neutralautolysaten aus Basthefe Nürnberg ausgeführt worden.

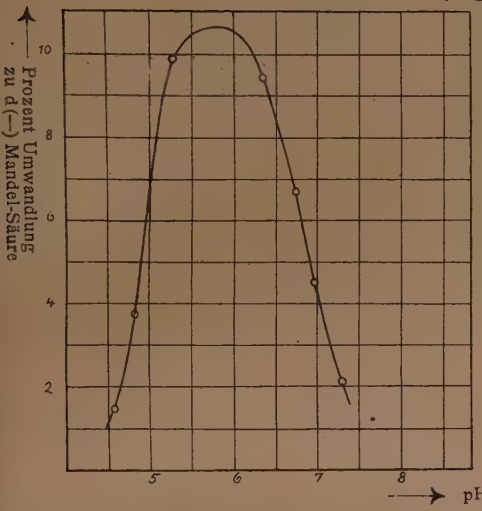
### Aktivitäts-pH-Kurve.

50 g Basthefe mit Essigester verflüssigt werden $3^1/_2$ Stunden unter stetigem Neutralisieren (50 ccm 2-prozentige Natronlauge) autolysiert und nach dem Abzentrifugieren das Autolysat auf 100 ccm im Messkölbchen verdünnt. Pro Versuch werden je 10 ccm Autolysat mit 5 ccm Substratlösung (0,3 g Phenylglyoxalhydrat) und 30 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphat angesetzt und 39 Stunden bei 30° belassen. Gesamtvolumen 45 ccm; davon dienten je 5 ccm für die elektrometrische pH-Bestimmung, die einige Tage nach Beendigung des Versuches vorgenommen wurde. Die Anfangs-pH-Werte sind nicht gemessen worden, dafür ist die Acidität, die sich aus der Zusammensetzung der Puffer berechnet, in der Tabelle verzeichnet. Die Differenz pH ber.—pH gef. beruht wohl nur teilweise auf der Bildung von Mandelsäure, es trat nämlich beim längeren Stehen unter Toluol Flockung ein. Die Farbe der überstehenden Flüssigkeit war in den sauersten Lösungen hellgelb und vertiefte sich nach der alkalischen Seite zu orange. Die Drehungswinkel und Bisulfitverbrauche der Tabelle IX beziehen sich auf je 40 ccm Reaktionsgemisch.

---

[84] H. S. Bd. 151 S. 268 (1925).

Tabelle IX (Fig. 2).




| pH | $\alpha_D 20^0$ | % Umsatz zu aktiv. S. |
|---|---|---|
| 7,31 | —0,18 | 2,0 |
| 7,00 | —0,40 | 4,4 |
| 6,78 | —0,59 | 6,6 |
| 6,41 | —0,84 | 9,3 |
| 5,33 | —0,88 | 9,8 |
| 4,85 | —0,33 | 3,7 |
| 4,57 | —0,13 | 1,4 |

Aktivitäts-pH-Kurve (Autolysat v. Basthefe)

| pH ber. | pH gef. elektr. | $\alpha_D^{20}$ 2 dm Rohr (°) | d (—) Mandels. gef. (mg) | ccm 0,1 n $NaHSO_3$ verbr. | Gesamt-Mandels. gef. (mg) | aktive Mandels. % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5,5 | 4,57 | —0,13 | 4,3 | — | — | — |
| 5,9 | 4,85 | —0,33 | 11,0 | 1,39 | 11,1 | 99,1 |
| 6,4 | 5,33 | —0,88 | 29,3 | 3,95 | 31,5 | 93,4 |
| 7,1 | 6,41 | —0,84 | 28,0 | 3,03 | 24,2 | 116,0 |
| 7,6 | 6,78 | —0,59 | 19,7 | 2,41 | 19,2 | 96,6 |
| 8,0 | 7,00 | —0,40 | 13,3 | 1,89 | 10,6 | 79,7 |
| 8,5 | 7,31 | —0,18 | 6,0 | — | — | — |
| — | 9,2 | +0,00 | — | — | — | — |

Aus den Versuchsdaten geht hervor, dass die von den Hefeautolysaten gebildete Mandelsäure unabhängig vom pH optisch fast rein ist. Die Schwankungen in den Prozentzahlen sind zum Teil auf Ungenauigkeiten der Methode, zum Teil darauf zurückzuführen, dass nicht zu jedem Versuch ein Leerversuch angestellt wurde.

### c) Phenylglyoxalkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit.

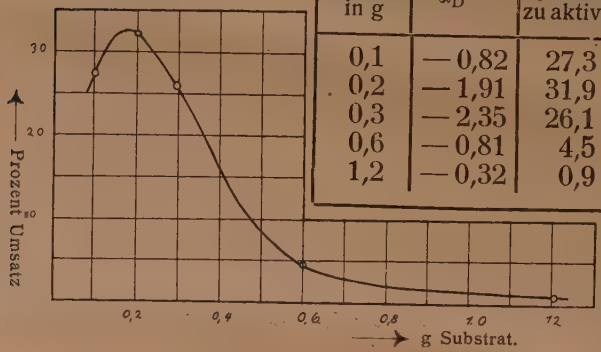
Die Abhängigkeit der Mandelsäurebildung von der Substratkonzentration lässt sich bei Anwendung von Hefeautolysaten nur für

verhältnismässig verdünnte Lösungen genau untersuchen. Sind mehr als 1 g Phenylglyoxalhydrat in 100 ccm enthalten, so findet Ausflockung statt und die Reaktionsgeschwindigkeit wird kleiner als in verdünnten Lösungen. Bei einer Phenylglyoxalkonzentration von 2,5% ist die Ausflockung sehr stark und es werden nur noch geringfügige Umsätze erzielt. Die optimale Substratkonzentration beträgt nach Tabelle X und Fig. 3 0,6%. Diese und die verdünnteren Lösungen blieben während der Versuchsdauer ohne Niederschlag.

Je 10 ccm Autolysat aus Basthefe entsprechend 5 g frischer Hefe (Autolysedauer 18 Stunden) + 20 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphat vom pH 6,4 + die angegebenen Mengen Phenylglyoxalhydrat zu 50 ccm. Reaktionsdauer 39 Stunden bei 30°.

Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit
(Prozentumsatzkurve)

Figur 3




| Substrat in g | $\alpha_D^{20}$ | % Umsatz zu aktiv S. |
|---|---|---|
| 0,1 | —0,82 | 27,3 |
| 0,2 | —1,91 | 31,9 |
| 0,3 | —2,35 | 26,1 |
| 0,6 | —0,81 | 4,5 |
| 1,2 | —0,32 | 0,9 |

Tabelle X.

| Substrat in 50 ccm (g) | $\alpha_D^{20}$ 2 dm Rohr (°) | d(—)Mandels. gef. (mg) | ccm 0,1 n $NaHSO_3$ verbr. | Gesamt-Mandels. gef. (mg) | aktive Mandels. % |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 | —0,82 | 27,3 | 3,19 | 25,5 | 107,2 |
| 0,2 | —1,91 | 63,7 | 8,19 | 65,9 | 96,7 |
| 0,3 | —2,35 | 78,3 | 8,93 | 71,3 | 109,9 |
| 0,6 | —0,81 | 27,0 | 3,11 | 24,8 | 108,8 |
| 1,2 | —0,32 | 10,7 | 1,45 | 11,5 | 93,0 |

### d) Glyoxalasemenge und Reaktionsgeschwindigkeit.

Zwischen Glyoxalasemenge und Reaktionsgeschwindigkeit fand ich direkte Proportionalität. Es wurden mit wechselnden Enzymmengen gleiche Umsätze erhalten, wenn das Produkt aus Enzymmenge und Reaktionsdauer konstant war. Bei geringer Glyoxalasemenge und mehrtägiger Versuchsdauer ist allerdings, vermutlich infolge von Enzymzerstörung diese Gesetzmässigkeit nicht mehr zu erkennen.

Reaktionsvolumen 60 ccm; pH 6,4; Temp. 30°

| ccm Hefeautolysat | Zeit in Minuten | $\alpha_D^{20}$ im 2 dm-Rohr |
|---|---|---|
| 30 | 440 | —2,39 |
| 20 | 660 | —2,37 |
| 10 | 1320 | —2,40 |
| 5 | 2640 | —1,84 |

### e) Temperaturoptimum.

Das Temperaturoptimum liegt bei pH 6,4, 24-stündiger Versuchsdauer und einer Phenylglyoxalkonzentration von 0,3 g Hydrat in 45 ccm Reaktionsvolumen in der Nähe von 30°. Bei 40° fand starke Ausflockung statt.

Je 10 ccm Autolysat aus Basthefe (= 5 g Frischhefe).

Tabelle XII.

| Temperatur (°) | $\alpha_D^{20}$ im 2 dm-Rohr (°) | d (—) Mandels. gef. (mg) |
|---|---|---|
| 0 | —0,43 | 14,3 |
| 18 | —0,78 | 26,0 |
| 30 | —1,12 | 37,3 |
| 40 | —0,58 | 19,3 |

### f) Zeitlicher Verlauf.

Der zeitliche Verlauf der Reaktion wird durch die Tabellen XIII—XVII und die Figuren 4 und 5 veranschaulicht. Bei vollständiger Umwandlung in linksdrehende Mandelsäure hätte sich in Tabelle XIII anstatt des gefundenen Endwertes von —2,7° ein Drehungswinkel von —9° ergeben müssen.

Tabelle XIII (Fig. 4, Kurve —○—○—)

Kinetik der Mandelsäurebildung.

60 ccm Hefeautolysat (Basthefe vom 5. 6. 26) + 180 ccm $\frac{m}{5}$ Phosph. pH = 6,4 + 2,1 g Phenylglyoxalhydrat zu 270 ccm. Temperatur 30°. Nach den angegebenen Zeiten wurden je 40 ccm entnommen.

| Zeit (Min.) | $\alpha_D^{20}$ (°) im 2 dm-Rohr | d (—) Mandels. gef. (mg) | Umsatz % |
|---|---|---|---|
| 300 | —1,50 | 50,0 | 16,7 |
| 700 | —2,14 | 71,3 | 23,8 |
| 1200 | —2,45 | 81,7 | 27,2 |
| 2025 | —2,66 | 88,7 | 29,6 |
| 2860 | —2,67 | 89,0 | 29,7 |
| 5500 | —2,69 | 89,7 | 29,9 |

100 ccm Hefeautolysat (Hefe Olten v. 5. 11. 26.) + 100 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer pH 7,00 + 40 ccm Phenylglyoxalhydratlösung (1,8 g Hydrat) Gesamtvolumen 240 ccm. Nach den angegebenen Zeiten werden je 40 ccm Lösung entnommen. Temperatur 30°.

Tabelle XIV (Fig. 4, Kurve —×—×—).

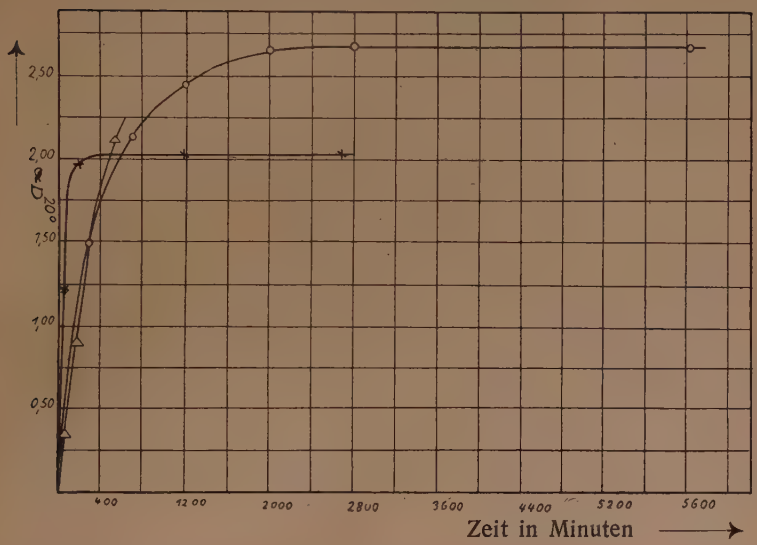
| Zeit (Min.) | $\alpha_D^{20}$ (°) im 2 dm-Rohr | d (—) Mandelsäure gef. (mg) | Umsatz % |
|---|---|---|---|
| 60 | —1,22 | 40,7 | 13,6 |
| 190 | —1,97 | 65,7 | 21,9 |
| 2670 | —2,04 | 68,0 | 22,7 |

Derselbe Ansatz pH 4,85.

Tabelle XV (Fig. 4, Kurve—△—△—).

| Zeit (Min.) | $\alpha_D^{20}$ (°) im 2 dm-Rohr | d (—) Mandels. gef. (mg) | Umsatz % |
|---|---|---|---|
| 60 | —0,35 | 11,7 | 3,9 |
| 190 | —0,89 | 29,7 | 9,9 |
| 540 | —2,12 | 70,7 | 23,6 |

Kinetik der Mandelsäurebildung.




In drei Flaschen befinden sich je 80 ccm Hefeautolysat (Oltenhefe 8. 11. 26) und je 20 ccm Substratlösung (je 0,735 g Substrat). Hierzu werden in zwei Fällen 100 ccm $\frac{m}{5}$ sek. Phosph.-Lösung gegeben und mit Natronlauge mit Hilfe der Indikatoren Naphtolphtalein und Phenolphtalein pH 8 bezw. pH 9 eingestellt. Der dritten Probe werden 100 ccm $\frac{m}{5}$ Phosph.-Lösung vom pH 7,5 zugesetzt. Gesamtvolumen 230 ccm, Temperatur 30°. Nach den angegebenen Zeiten werden aus den 3 Ansätzen je 40 ccm Lösung herauspipettiert.

Tabelle XVI (Fig. 5, Kurve —△—△—); pH 7,5.

| Zeit (Min.) | $\alpha_D^{20}$ (°) im 2 dm-Rohr | d (—) Mandels. gef. (mg) | Umsatz % |
|---|---|---|---|
| 33 | —1,26 | 42,0 | 28,8 |
| 60 | —1,40 | 46,7 | 32,0 |
| 300 | —1,56 | 52,0 | 35,6 |
| 2880 | —1,71 | 63,7 | 43,6 |

Fig. 5 (Kurve --□--□--); pH 8.

| | | | |
|---|---|---|---|
| 33 | —1,09 | 36,3 | 24,9 |
| 60 | —1,15 | 38,3 | 26,2 |
| 300 | —1,15 | 38,3 | 26,2 |
| 2880 | —1,23 | 40,7 | 37,9 |

Fig. 5 (Kurve —×—×—); pH 9.

| | | | |
|---|---|---|---|
| 33 | —0,55 | 18,3 | 12,5 |
| 60 | —0,62 | 20,7 | 14,2 |
| 300 | —0,75 | 25,0 | 17,1 |
| 2880 | —0,76 | 25,3 | 17,3 |

Es zeigt sich, dass der grösste Umsatz, wie nach den Daten der Aktivitäts-pH-Kurve zu erwarten war, bei pH 7,5 und der kleinste bei pH 9 erzielt wird.

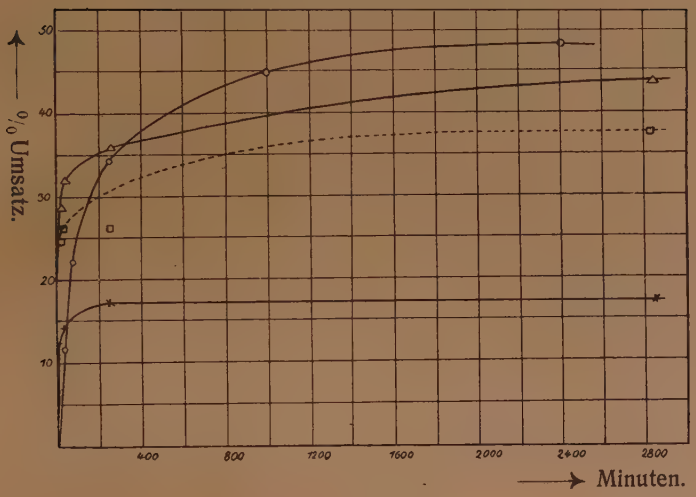
Aus der Tabelle geht hervor, dass im Ansatz pH 8 und 9 die Reaktionsdauer verhältnismässig gering ist, nach 60 bezw. 300 Minuten ist der Höchstwert des Umsatzes schon erreicht. Im Ansatz pH 7,5 ist die Reaktionsdauer erheblich grösser und der erzielte Umsatz höher als in den beiden anderen Fällen. 100 ccm Enzymlösung (Hefe Olten 27. 10. 26) + 100 ccm Phosphatpuffer pH 6,0 (optimale H-Ionenkonzentration für das Hefenenzym) + 30 ccm Substratlösung (1,350 g Phenylglyoxalhydrat). Nach den angegebenen Zeiten werden je 40 ccm Lösung entnommen.

Tabelle XVII (Fig. 5, Kurve —○—○—).

| Zeit (Min.) | $\alpha_D^{20}$ (°) im 2 dm-Rohr | d (—) Mandels. gef. (mg.) | Umsatz % |
|---|---|---|---|
| 1. 70 | —0,86 | 28,7 | 11,9 |
| 2. 150 | —1,57 | 52,3 | 22,3 |
| 3. 300 | —2,41 | 80,3 | 34,2 |
| 4. 990 | —3,23 | 107,7 | 44,8 |
| 5. 2430 | —3,39 | 113,0 | 48,1 |

Der in 5 erzielte Umsatz erreicht hier beim optimalen pH einen Höchstwert. Die sich aus 1, 2 und 3 für monomolekulare Reaktion berechnenden Konstanten geben die Werte: 1. k = 0,000182, 2. k = 0,000180, und 3. k = 0,000180, wenn der Grenzwert der gebildeten d (—) Mandelsäure zu 113 mg angenommen wird.

Figur 5 (zu Tabelle XVI und XVII)
Kinetik der Mandelsäurebildung.




## g) Lebende Hefe.

Die Bestimmung der Phenylglyoxalase in lebender Hefe erfolgt ohne Zusatz eines Antiseptikums. Es werden z. B. 5 g Frischhefe mit 30 ccm Phosphatpuffer angeschlämmt und zu 10 ccm Substrat entsprechend 0,3 g Phenylglyoxalhydrat gegeben. Die Unterbrechung der Reaktion wird in der üblichen Weise durch Zusatz von 5 ccm 25-prozentiger Phosphorsäure vorgenommen. Das nach Fällung mit Ammonsulfat erhaltene Filtrat lässt sich meist ausäthern, da die bei den Autolysaten stark störenden Emulsionen hier nur unerheblich sind. Optische Kontrollversuche ohne Substrat sind entbehrlich.

**Beispiele für Wirksamkeit und optische Spezifität verschiedener Hefen.**

Reaktionszeit 2300 Minuten bei pH 7,5; Temperatur 30°.

Die nachstehende Tabelle XVIII lässt erkennen, dass die untersuchten Hefen zwar hinsichtlich des Drehungssinnes der gebildeten Mandelsäure übereinstimmen, dass aber in Bezug auf das Verhältnis von aktiver zu Gesamtsäure nicht unbedeutende Unterschiede auftraten. Während eine Hefe der Sinner A.-G. nur 38% aktive und 62% racemische Mandelsäure liefert, erzeugt eine Hefe von Bast Nürnberg 81-prozentige linksdrehende Säure.

Tabelle XVIII.

| Hefe 5 g Frischhefe | $\alpha_D^{20}$ im 2 dm Rohr (°) | d (—) Mandels. gef. (mg) | ccm 0,1 n Na $HSO_3$ verbr. | Gesamt-Mandelsäur gef. (mg) | aktive Mandelsäur % |
|---|---|---|---|---|---|
| Löwenbrauerei 24. 4. 26 | —0,45 | 15,0 | 3,58 | 28,6 | 52,4 |
| Spatenbrauerei 3. 5. 26 | —1,19 | 39,5 | 7,38 | 59,0 | 67,3 |
| Hackerbrauerei 3. 5. 26 | —1,43 | 47,7 | 9,18 | 73,2 | 65,1 |
| Basthefe-Nürnb. 5. 5. 26 | —1,47 | 49,0 | 10,22 | 81,6 | 60,1 |
| Basthefe-Nürnb. 2. 7. 26 | —2,15 | 71,6 | 11,04 | 88,1 | 81,2 |
| Hefe M. 14. 5. 26 | —1,57 | 52,3 | 10,16 | 81,1 | 64,4 |
| Sinner-Hefe 3. 5. 26 | —0,94 | 31,3 | 10,18 | 83,1 | 37,7 |
| Hefe Olten 27. 10. 26 | —0,94 | 31,3 | 6,54 | 51,2 | 61,1 |

Olten-Hefe Reaktionsdauer nur 840 Minuten und 0,2 g Substrat.

### h) Versuche mit Trockenhefen.

Es wurde eine Trockenhefe der Löwenbrauerei (15. I. 24, getrocknet bei 21—28°) und eine frisch bereitete Trockenhefe Olten (30. VI. 27) acht Tage alt auf Glyoxalasegehalt geprüft.[85] Für die Versuche mit dem dreijährigen Präparat waren die Ergebnisse negativ, dagegen zeigte es sich, dass frische Trockenpräparate sehr starke Wirksamkeit besitzen.

| Trockenhefe in g | $\alpha_D^{20}$ 2 dm-Rohr (°) | d (—) Mandels. gef. | Versuchsdauer pH 6 |
|---|---|---|---|
| Löwenbrauerei 2 | +0,00 | — | 24 Std. |
| Olten 5 | —3,08 | 102,7 | 30 „ |

[85] Bereitung: Die frische Hefe wird fein zerbröckelt auf Filtrierpapier an der Luft ausgebreitet und acht Tage getrocknet. Dann wird sie im Mörser zerrieben und durch ein Sieb geschüttelt.

### i) Autolysedauer und Enzymmenge.

Bei der Autolyse von Basthefe mit Essigester bei neutraler Reaktion geht die Glyoxalase in Zeiten, die für die quantitative Freilegung von Saccharase und von Maltase aus Löwenbräuhefe ausreichen,[86] nur unvollständig in Lösung.

Es ist zweckmässig, die Dauer der Autolyse auf 18—22 Stunden bei Zimmertemperatur auszudehnen. (Dabei ist es nur in den ersten 3—4 Stunden notwendig, dauernd neutral zu halten, doch muss vor dem Abzentrifugieren die Enzymlösung wieder gegen Lackmus neutral gemacht werden.) Aber auch dann wird die Wirksamkeit der angewandten Frischhefe nicht erreicht.

Für die folgenden Versuche wurden Proben der autolysierenden Hefe nach den angegebenen Zeiten abzentrifugiert. Die überstehenden Lösungen wurden bis zur Fertigstellung der Enzymversuche mit längster Autolysedauer aufbewahrt, um alle gleichzeitig dem Substrat zuzusetzen.

Je 5 g Frischhefe bezw. die entsprechende Menge Autolysat. Reaktionsdauer 2340 Min. Temp. 30° pH 7,5

| | |
|---|---|
| Basthefe vom 15. 6. 25. frisch: $\alpha_D^{20'}$ 2 dm-Rohr | —1,47° |
| Autolysat daraus Autolysedauer $3^1/_2$ Stunden | —0,80° |
| Basthefe vom 22. 6. 26. frisch | —2,15° |
| Autolysat daraus Autolysedauer 2 Stunden $\alpha_D^{20}$: | —0,30° |
| „ „ „ 6,5 „ „ : | —0,70° |
| „ „ „ 22 „ „ : | —0,84° |

### j) Änderung der optischen Spezifität bei der Autolyse.

Im Anfang meiner Untersuchung hielt ich es für möglich, dass das unbefriedigende Ergebnis der Autolysen teilweise auf einer Änderung der optischen Spezifität des Enzyms beim Lösungsvorgange beruhe, dass in der lebenden Hefezelle die Bildung aktiver Mandelsäure bevorzugt sei.

Die Verhältnisse liegen aber genau umgekehrt: Die durch die Autolysate gebildete Mandelsäure ist in der Regel optisch rein, was auch schon aus den oben angeführten Daten der Reaktionskinetischen Messungen hervorgegangen ist.

---

[86] H. S. Bd. **151**, S. 268 (1925).

Beispiele für die Spezifitätsänderung bei der Autolyse.

Hefeautolysate entsprechend 5 g Frischhefe deren Wirksamkeiten und optische Spezifitäten in Tabelle XVIII verzeichnet sind.

Tabelle XIX.

| Autolysat aus Hefe von | $\alpha_D^{20}$ 2 dm Rohr (°) | d (—) Mandels. gef. (mg) | ccm 0,1 n $NaHSO_3$ verbr. | Gesamt-Mandels. gef. (mg) | % aktiv. Mandels. | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Auto-lysat | frische Hefe |
| Löwenbrauerei 24. 4. 26 | —0,92 | 30,7 | 6,00 | 47,8 | 64,2 | 52,4 |
| Spatenbrauerei 3. 5. 26 | —0,61 | 20,3 | 2,50 | 20,0 | 101,6 | 67,3 |
| Hackerbrauerei 3. 5. 26 | —0,75 | 25,0 | 3,06 | 24,4 | 102,4 | 65,1 |
| Bast-Nürnberg 5. 5. 26 | —0,82 | 27,3 | 3,98 | 31,7 | 86,2 | 60,1 |
| Bast-Nürnberg 2. 7. 26 | —0,84 | 28,0 | 3,46 | 27,6 | 101,4 | 81,2 |
| Sinner-Hefe 3. 5. 26 | —0,47 | 15,6 | 2,28 | 18,1 | 86,2 | 37,7 |
| Hefe-Olten 27. 10. 26 | —2,41 | 80,3 | 9,96 | 79,5 | 100,9 | 61,1 |

Im Falle der Löwenbräuhefe und der Basthefe vom 5. 5. 26 wurden verhältnismässig kleine Änderungen beobachtet. Die grössten Verschiebungen finden statt bei Hefe Olten, die im frischen Zustande 61 % der gesamten Mandelsäure in linksdrehender Form erzeugte, dagegen als Autolysat optisch reine Säure bildete sowie bei Sinnerhefe vom 3. 5. 26, bei welcher sich das Verhältnis optisch aktiver zu gesamter Mandelsäure von 37,7 % zu 86,2 % verschob.

Die im lebenden Zustand sehr glyoxalasereiche Hefe M liess sich mit Essigester nur sehr langsam verflüssigen und lieferte ein Autolysat von so geringer Aktivität, dass die Zusammensetzung der gebildeten Mandelsäure nicht mehr genau ermittelt werden konnte.

### k) Haltbarkeit der Hefeglyoxalase.

Die Haltbarkeit der Ketoaldehydmutase aus Hefe in den Autolysaten ist viel grösser als die des tierischen Enzyms in Leber- und Muskelauszügen, sodass die Hefeglyoxalase für reaktions-

kinetische Messungen und für Reinigungsversuche geeigneter erscheint als Leberglyoxalase. Doch hindert die schlechte Filtrierbarkeit der Hefeenzymlösungen und das Auftreten von Emulsionen beim Ausäthern nach der oben angegebenen Methode die rasche Aufarbeitung der Versuche. Wo es auf grosse Genauigkeit bei der Ermittlung der gebildeten Mandelsäuremengen ankommt, ist die Anwendung der Leberauszüge vorzuziehen.

## VIII. Über das Adsorptionsverhalten der Leber- und Hefeglyoxalase.

Bei der Betrachtung der optischen Spezifität der Glyoxalasen aus Hefe wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass bei ein und derselben Hefe das Verhältniss der gebildeten aktiven zur Gesamtmandelsäure verschieden war je nachdem die Mutase der Frischhefe oder die des aus dieser Hefe gewonnenen Autolysates angewandt wurde. Die Tatsache verlockt zu dem Schluss, dass weitgehend gereinigte Glyoxalasen ihre optische Spezifität dahin ändern, dass nur noch eine der beiden optischen Formen der Mandelsäure gebildet wird.

Ich habe untersucht, ob sich Hefe- und Leberglyoxalase adsorbieren lassen und in den Fällen, da Adsorption festzustellen war, auch Elutionsversuche vorgenommen.

### *A. Adsorption von Hefe- und Leberenzym.*

### 1. Ausführung der Versuche.

a) Beim Hefeenzym. Je 25 ccm Hefeautolysat entsprechend 7,5 g Frischhefe werden in Erlenmeyerkölbchen mit dem Adsorptionsmittel gut durchgeschüttelt und rasch zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird dekantiert und davon je 20 ccm mit 10 ccm Phenylglyoxalhydratlösung und 30 ccm Phosphatpuffer pH 6 angesetzt. Ein Vergleichsversuch mit derselben Rohenzymmenge unter denselben Bedingungen ausgeführt gibt an, ob Enzym adsorbiert wurde.

b) Beim Leberenzym. In genau gleicher Weise wurden die Adsorptionsversuche mit Leberglyoxalase angestellt. Meist wurden 70 ccm 20-prozentiger Leberenzymlösung angewandt. Bei allen Versuchen ist die Enzymlösung, wenn alkalisch oder sauer adsorbiert wurde, vor der Zugabe der optimalen Puffer zu neutralisieren.

## 2. Adsorptionsverhalten des Hefeenzyms.

Es wurde auf diese Weise festgestellt, dass Hefeenzym sich aus neutraler Lösung an $Al(OH)_3C\gamma$[87] adsorbieren lässt, ebenso an $SiO_2$ und an Tierkohle. Die Adsorptionsmittel nehmen jedoch nie die ganze Enzymmenge auf, sondern höchstens $^1/_3$ derselben, manchmal auch weniger. Nur in einem Fall, wo 5 g Tierkohle Merck-Darmstadt auf 20 ccm Hefeautolysat trafen, wurde das ganze Enzym aufgenommen. Es scheint sich ein Gleichgewicht einzustellen zwischen der Enzymkonzentration in der Mutterlauge und der im Adsorbens. Kaolin „Plauson" hat ebenfalls nicht das Enzym zu adsorbieren vermocht, dafür aber irgendwelche Hemmungsstoffe desselben aus der Lösung herausgenommen. Die Adsorptionsmutterlauge vermochte mehr aktive Säure zu bilden als das Roh-enzym im Vergleichsversuch.

Beispiele für Hefeglyoxalaseadsorption.

| Angewandte Enzymlösung | Adsorptionsmittel | $\alpha_D^{20\,0}$ der Adsorptionsmutterlauge 2 dm-Rohr (°) | $\alpha_D^{20\,0}$ des Vergleichsversuches im 2 dm-Rohr (°) |
|---|---|---|---|
| 20 ccm Hefeautolysat = 7,5 g frische Basthefe | 30 ccm $Al(OH)_3C\gamma$ | — 0,71 | — 2,97 |
| „ „ | 5 g $SiO_2$ Kahlbaum gepulv. | — 0,71 | — 2,97 |
| „ „ | 5 g Tierk. Merck | ± 0,00 | — 1,63 |
| „ „ | 5 g Asbest gepulv. | — 2,57 | — 2,97 |
| „ „ | 20 ccm Kaolin „Plauson" | — 1,98 | — 1,63 |

[87] 30 ccm des angewandten $Al(OH)_3C\gamma$ enthalten 0,432 g $Al_2O_3$.

## 3. Adsorptionsverhalten des Leberenzyms.

Die Leberglyoxalase wird adsorbiert in neutraler und saurer Lösung von $Al(OH)_3C\gamma$, ebenso von $SiO_2$ in neutraler saurer und alkalischer Lösung. Jedoch ist die Adsorption an Kieselsäure in alkalischer und saurer Lösung gering. Gepulverter Kaolin adsorbiert aus neutraler Lösung aus saurer und alkalischer Lösung ebenfalls, jedoch schwächer.

Beispiele für Leberglyoxalaseadsorption.

| Angewandte Enzymlösung | Adsorptionsmittel | $\alpha_D^{20}$ der Adsorptionsmutterlauge 2 dm-Rohr (°) | $\alpha_D^{20}$ des Vergleichsversuches im 2 dm-Rohr (°) |
|---|---|---|---|
| 70 ccm Leberenzym neutral | 25 ccm $Al(OH)_3C\gamma$ | — 0,76 | — 2,18 |
| 70 „ Leberenzym alkalisch | 5 g $SiO_2$ gep. Siegfried | — 2,40 | — 3,31 |
| 70 „ neutral | „ | — 0,76 | — 2,18 |
| 70 „ Leberenzym sauer | „ | — 2,83 | — 3,31 |
| 70 „ Leberenzym neutral | 5 g Kaolin gep. Siegfried | — 1,04 | — 2,18 |
| 70 „ Leberenzym sauer | „ | — 2,42 | — 3,31 |
| 70 „ Leberenzym alkalisch | „ | — 2,47 | — 3,31 |

Das Adsorptionsverhalten der Leberglyoxalase gleicht also in den untersuchten Fällen dem des Hefeenzyms. Auch hier keine völlige Aufnahme der Glyoxalase durch das Adsorbens.

## *B. Elution von Hefe- und Leberenzym.*

### 1. Ausführung der Versuche.

Die Elutionsversuche wurden für das Hefe- und Leberenzym ähnlich durchgeführt. Nach erfolgter Adsorption wurde das abzentrifugierte und von der Mutterlauge befreite Adsorbat mit destilliertem Wasser in ein Erlenmeyerkölbchen übergespült und je nach der Art der Elution mit 1-prozentigem sekundärem Phosphat oder mit 1-prozentiger Essigsäure versetzt. Mit Ammoniak zu eluieren wurde vermieden wegen Glyoxalinbildung mit dem Substrat. Nach gutem Durchmischen mit dem Eluens wurde wieder abzentrifugiert und zur Feststellung der Enzymaktivität das klare Zentrifugat nach erfolgter Neutralisation mit Substrat und Pufferlösung versetzt.

### 2. Elution des Hefeenzyms.

Die Elutionen, die ich mit Hefeenzym vornahm, fielen negativ aus. Nur in einem Falle einer Elution mit sekundärem Phosphat aus Kieselsäureadsorbat liess sich eine Spur Enzym herauslösen. Elutionsversuch: $\alpha_D^{20}$—0,10°. Vergleichsversuch $\alpha_D^{20}$— 1,63°.

### 3. Elution des Leberenzyms.

Bei den später durchgeführten Versuchen mit Leberenzym wurde das Adsorbat nicht mit destilliertem Wasser, sondern mit sekundärem Phosphat übergespült und zur Elution eventuell noch mit einigen Tropfen (bis zu 10) 0,1 n-Lauge versetzt. Es wurde nur alkalisch eluiert. Die H-Ionenkonzentrationen wurden wie bei allen Adsorptions- und Elutionsversuchen mit Indikatoren wie Lackmus und Phenolphtalein ungefähr bestimmt. Dabei zeigte es sich, dass das Leberenzym bei der Elution pH 9 für kurze Zeit verträgt. Der Ansatz erfolgt wie oben angegeben.

Beispiele für Leberglyoxalaseelution (Tab. XX).

| Adsorptionsmittel und Art der Adsorption | Art der Elution | $\alpha_D^{20°}$ 2 dm-Rohr (°) |
|---|---|---|
| aus bik. alk. Lösung an $SiO_2$ | sek. Phosph. + freie Lauge | — 0,52 |
| | " " | |
| aus essigs. Lösung an $SiO_2$ | Phenolphtalein eben gerötet | — 0,50 |
| " " " " " | " " | — 1,02 |
| aus neutr. Lösung an $Al(OH)_3$ | " " | — 1,07 |
| aus bik. alk. Lösung an $SiO_2$ | " " | — 0,25 |

Es vermag also die Leberglyoxalase aus der Adsorption an $Al(OH)_3C_\gamma$ und $SiO_2$ herausgelöst zu werden. Die Ausbeute an Enzym ist jedoch meist nicht quantitativ. Doch mag bei den erhaltenen kleinen Werten eine Enzymzerstörung durch zu hohe H-Ionenkonzentration mitspielen.

## *C. Änderung der Spezifität durch Reinigung.*

Es wurde die Änderung der optischen Spezifität des Enzyms durch Reinigung nur in wenigen Versuchen verfolgt.

Beispiele (Tab. XXI).

| Enzym | $\alpha_D^{20°}$ 2 dm-Rohr (°) | d (—) Mandels. gef. (mg) | ccm 0,1n $NaHSO_3$ verbr. | Mandels. gef. (mg) | % Mandels. aktiv. |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Tab. XX Vers. 4. | — 1,07 | 36,6 | 5,58 | 44,5 | 82,2 |
| 2. " " " 3. | — 1,02 | 34,0 | 4,74 | 38,4 | 88,5 |
| 3. Mit $Al(OH)_3C_\gamma$ ger. Enzym | — 2,52 | 84,0 | 12,79 | 101,4 | 82,8 |
| 4. Vergl. Versuch Rohleberenzym | — 2,70 | 90,0 | 14,39 | 115,0 | 78,2 |

Aus den in Tabelle XXI angeführten Daten kann man erkennen, dass die Mandelsäure, die durch Wirkung eluierter Leberglyoxalase erhalten wurde, optisch reiner ist als die durch gewöhnliches Leberenzym erzeugte. Ebenso ist die durch Aktivität der Adsorptionsmutterlauge erhaltene Säure optisch reiner geworden.

## *D. Weitere Reinigungsmöglichkeiten für die Leberglyoxalase.*

H. W. Dakin und H. W. Dudley[88] haben das Leberenzym zu reinigen versucht, indem sie nach dem Filtrieren der Leberauszüge das Enzym mit Ammonsulfat niederschlugen, den Niederschlag wieder in Wasser aufnahmen und die so gewonnene Lösung des Enzyms noch dialysierten. C. Neuberg[89] reinigte das Enzym nach der Vorschrift, die M. Jakoby für die Reinigung von Leberoxydasen gegeben hat. Diese Methode ist kurz folgende: Das Enzym wird aus seiner wässrigen Lösung mit Ammonsulfat niedergeschlagen und der Niederschlag in destilliertes Wasser aufgenommen. Aus dieser Lösung wird die Glyoxalase mit Alkohol gefällt. Nachdem der Niederschlag wieder in destilliertes Wasser aufgenommen ist, wird mit Uranylacetat die Glyoxalase nochmals niedergeschlagen, dann wird die Fällung, welche das Enzym enthält, wieder in Wasser gelöst.

---

[88] Jl. of Biol. Chem. Bd. 15, S. 426—27 (1913).
[89] Bioch. Zs.. Bd. 51, S. 486 (1913).
M. Jakoby H. S. Bd. 30, S. 135 (1900) u. zw. S. 136.

# Zur Kenntnis der Antiglyoxalase.

# Disposition.


| | Seite |
|---|---|
| I. Einleitung | 69 |
| II. Zur Natur der Antiglyoxalasewirkung | 70 |
| III. Bedeutung der Antiglyoxalase | 79 |
| IV. Antiglyoxalase und Hefenglyoxalase | 81 |
| V. Vermag Antiglyoxalase die Milchsäuregärung zu hemmen? | 82 |
| VI. Antiglyoxalase und Carcinomstoffwechsel | 83 |
| VII. Beschreibung der Versuche | 84 |
| 1. Zur quantitativen Bestimmung des Phenylglyoxals | 84 |
| 2. Ausführung der Bestimmung des Phenylglyoxals bei der Reaktion mit Pankreaslösungen | 85 |
| 3. Bereitung der Pankreaslösungen | 85 |
| 4. Inkubationsversuche | 86 |
| a) Phenylglyoxal-Antiglyoxalase | 86 |
| Kinetik der Phenylglyoxalbindung durch Pankreaslösungen | |
| b) Antiglyoxalase-Glyoxalase | 90 |
| 5. Glyoxalasehemmungsversuche mit gekochter Pankreaslösung | 90 |
| 6. Hemmungsversuche mit Lymphe aus dem Duktus thoracicus | 91 |
| 7. Hemmungsversuche mit Bauchspeichel | 91 |
| 8. Hemmung der Hefeglyoxalase durch Antiglyoxalase | 92 |
| a) Autolysate | 92 |
| b) Frischhefe | 92 |
| 9. Antiglyoxalase und Erbsenglyoxalase | 93 |
| 10. Hemmungsversuch bei der Milchsäuregärung | 93 |
| VIII. Versuche zur Reinigung der Antiglyoxalase | 94 |
| 1. Dialysierversuche mit Antiglyoxalase | 94 |
| 2. Adsorptionsversuche mit Antiglyoxalase | 95 |
| 3. Elutionsversuche | 95 |

# I. Einleitung.

Die Fermente sind in ihren Wirkungen von den verschiedensten physikalischen und chemischen Einflüssen abhängig, indem sie bald Förderung bald Hemmung ihrer Aktivität erfahren.[1]

Ganz allgemein sind die Enzyme empfindlich gegen höhere Temperaturen, sie werden irreversibel zerstört. Von grösster Bedeutung für enzymatische Prozesse ist die H-Ionenkonzentration des Reaktionsmilieus. Für jedes Enzym gibt es ein mehr oder weniger breites H-Ionenkonzentrationsoptimum, bei dem es am stärksten wirksam ist. Ist die Acidität des Reaktionsmilieus sehr verschieden von der des Wirkungsoptimums, so kann die Aktivität eines Enzyms vollständig verschwinden. Die Tatsache, dass man solche unwirksame Enzyme durch pH verändernde Stoffe aktivieren kann, erklärte man sich so, dass das Enzym als Vorstufe, als Zymogen vorliegt und erst durch den zugesetzten Stoff in die wirksame Form übergeführt wird. So sollte z. B. Salzsäure Propepsin in Pepsin umwandeln. Eine grosse Zahl solcher Irrtümer ist durch das Studium der Enzymreaktionen unter Berücksichtigung der H-Ionenkonzentration beseitigt worden; man nimmt an, dass die Enzyme amphotere Elektrolyte sind, deren Wirksamkeit vom Dissoziationszustand abhängt, der wiederum eine Funktion der H-Ionenkonzentration ist. Neben diesen Einflüssen von ganz allgemeiner Geltung gibt es solche, die sich auf engere Bereiche beziehen. Es gibt Enzyme, deren Wirksamkeit an die Gegenwart, bestimmter Ionen gebunden ist (so ist für die Labwirkung Ca unentbehrlich) und solche die bei Abwesenheit von Elektrolyten nicht wirksam sind, z. B. Amylase. G. Embden[2] hat einen Fall aufgefunden, wo gewisse Ionen die Richtung des katalysierten Prozesses bestimmen: Bei der Zymophosphatase bewirken Ca- und Fl-Ionen Synthese, Mg-, CNS-, J- und Cl-Ionen Zerfall von Zymophosphat. Schwermetallsalze wirken teils hemmend, teils aktivierend bei den verschiedensten Enzymen. Mannigfach sind die Erscheinungen, die bei Einwirkung

[1] Eine Übersicht über die Beeinflussung der Fermentwirkung durch äussere Faktoren findet sich in C. Oppenheimer-Kuhn, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl. im 3. Hauptteil.

[2] H. S. Bd. 134, S. 343 (1924).

organischer Stoffe auf die Enzyme eintreten, die zum Teil Veranlassung gaben zu Spekulationen über das Vorhandensein gewisser Gruppen im Fermentmolekül, doch soll hierauf nicht eingegangen werden.

Von grösstem Interesse sind die spezifischen Aktivatoren und Paralysatoren gewisser Enzyme.

Ihre Wirkungsweise kann verschieden sein. Die Aktivatoren können Enzyme aus einer unwirksamen Vorstufe in die eigentlich wirksame Form überführen, oder sie können den Reaktionsbereich eines Enzyms erweitern. Für die letztere Wirkungsart gibt es sehr gut untersuchte Beispiele, so die Aktivierung des Trypsins durch die Enterokinase. Das von der Bauchspeicheldrüse sezernierte Trypsin, welches nur Protamin oder Pepton langsam zu hydrolysieren vermag, wird durch die Einwirkung eines im Darmsaft vorkommenden Stoffes, der Enterokinase, zum energischen Angriff von genuinem Eiweiss befähigt. Bei den spezifischen Aktivatoren kann aber auch das Gegenstück zu dem eben angeführten Fall eintreten: Das Papain, eine pflanzliche Protease, wird durch Anlagerung von Blausäure in seinem Wirkungsbereich reduziert. Es ist ursprünglich für den Abbau hochmolekularer Proteine, nach Blausäureanlagerung nur noch für den Abbau von einfacher gebauten Substraten geeignet.[3]

Zu den spezifischen Paralysatoren gehört die Antiglyoxalase, welche die Bildung von Mandelsäure aus Phenylglyoxal durch Glyoxalase verhindert.

Dem Studium dieses Hemmungskörpers ist diese Arbeit gewidmet.

## II. Zur Natur der Antiglyoxalasewirkung.

Die charakteristischsten Merkmale der Antiglyoxalase sind schon von ihren Entdeckern H. D. Dakin und H. W. Dudley[4] beschrieben worden: Die Antiglyoxalase ist ein in dem Pankreasgewebe sich befindender Stoff, der die Fähigkeit hat, die Glyoxalasen tierischer Herkunft zu hemmen. Sie ist nicht dialysierbar, thermolabil und gegen schwache Alkalien weniger empfindlich als gegen schwache Säuren.

Ob der Hemmungskörper den Enzymen zuzuordnen sei, wird in den bis dahin über diesen Gegenstand erschienenen Arbeiten diskutiert, doch konnte über die wahre Natur der Antiglyoxalasewirkung noch nichts Entscheidendes ausgesagt werden. Ich habe

[3] R. Willstätter und W. Grassmann H. S. Bd. 138, S. 184 (1924).
[4] Jl. Biol. Chem. Bd. 15, S. 463 (1913).

mich mit dieser Frage befasst, die bis dahin von den verschiedenen Autoren gemachten Angaben überprüft und versucht neues Tatsachenmaterial zur Klärung des Problems beizubringen.

Für den Wirkungsmechanismus der Antiglyoxalase stehen drei Möglichkeiten offen:

1. Die Antiglyoxalase ist ein Enzym, ein Antiferment, welches die Glyoxalase auf katalytischem Wege zerstört, oder sie in eine unwirksame Form umlagert.

2. Die Antiglyoxalase hat keine Fermentnatur, sie ist ein spezifischer Paralysator, der in stöchiometrischer Reaktion etwa durch Maskierung der für die katalytische Wirkung der Glyoxalase verantwortlichen Gruppe dieselbe unwirksam macht.

3. Die Wirkung der Antiglyoxalase bezieht sich auf das Substrat: sie führt das Phenylglyoxal in eine für die Glyoxalasewirkung unbrauchbare Form über.

In meiner Untersuchung war das Hauptaugenmerk auf die Hypothese 3 gerichtet, weil mir die Frage nach der Natur der Antiglyoxalase im Hinblick auf die Versuchsergebnisse D. L. Fosters hier der Lösung am nächsten schien.

D. L. Foster hat sich in zwei Arbeiten[5] mit der Wirkung der Antiglyoxalase befasst und die Beobachtung gemacht, dass jedes Mal, wenn eine Hemmung der Glyoxalasewirkung zu konstatieren war, eine Orangefärbung des Reaktionsmilieus auftrat, die um so intensiver war, je weniger die Glyoxalase ihre Tätigkeit entfalten konnte. Über diese Gelbfärbung teilt Foster folgendes mit: Der färbende Stoff ging in den durch Kochen und Sättigen der Lösung mit Ammonsulfat entstehenden Niederschlag, blieb aber zum Teil auch in Lösung, diese färbend. In Äther aufgenommen wurde der Stoff rot, einigemale sogar blau.

Da diese Färbung auch ohne die Gegenwart der Glyoxalase auftrat, vermutete Foster, dass hier der Schlüssel zur Deutung der Antiglyoxalasewirkung gegeben sein könne. Ihre Meinung ist die, dass die Antiglyoxalase das Phenylglyoxal in eine polymere, gelb gefärbte Form überführe, die für die innere Cannizzaroreaktion nicht mehr verwertbar sei.

In der Tat liess eine 24-stündige Vorbehandlung des Phenylglyoxals mit Antiglyoxalaselösung bei 37° keine nennenswerte Glyoxalasewirkung mehr aufkommen, auch dann nicht, wenn nach dieser Vorbehandlung um jede enzymatische Wirkung der Antiglyoxalase auf Glyoxalase auszuschliessen, 20 Minuten lang vor Zugabe der Glyoxalaselösung die beiden anderen Reaktionskomponenten auf 120° druckerhitzt wurden.

[5] Bioch. Jl. Bd. 18, S. 562 (1924); Bioch. Jl. Bd. 19, S. 757 (1925).

Foster gelangt nun auf Grund ihrer Versuchsergebnisse zu folgendem vorsichtigen Urteil:[6] ... es können diese Experimente nicht entgültig entscheiden, ob die Wirksamkeit des Hemmungskörpers eher auf Phenylglyoxal als auf Glyoxalase gerichtet ist. Aber es sind zwei Tatsachen, die dies äusserst wahrscheinlich machen. Eine derselben ist die Erzeugung der gelben Farbe, welche unweigerlich die Hemmung begleitet, durch die Wirkung von Pankreasauszug auf Phenylglyoxal allein. Die andere Tatsache ist, dass die Hemmung, erzeugt durch den druckerhitzten Extrakt, auf die ganze Mischung (d. h. bei gleichzeitigem Zusammenbringen von Glyoxalase, Antiglyoxalase und Substrat) nur eine teilweise, während die Hemmung, erzeugt durch die Wirkung auf Phenylglyoxal allein, eine vollständige ist.

Die Angaben Fosters, das Auftreten der „orange colour" betreffend, konnte bis in fast alle Einzelheiten von mir bestätigt werden.[7] Eine unanfechtbare Sicherstellung des Reaktionsmechanismus im Sinne Fosters verlangte jedoch Methoden, die es gestatteten quantitativere Aussagen zu machen über das Schicksal des Phenylglyoxals bei der Einwirkung von Pankreaslösungen, als es eine Farbänderung des Reaktionsmilieus erlaubt.

Zwei Wege liessen sich finden, die geeignet schienen, die Annahme Fosters zu beweisen. Einmal die titrimetrische Verfolgung der Phenylglyoxalabnahme, die in wässriger Lösung unter dem Einfluss von Pankreaslösungen oder Pankreaspulver stattfindet. Die Bisulfitverbindung des Phenylglyoxals erwies sich als geeignet, zur quantitativen Bestimmung des Ketoaldehyds. Die Bestimmungsmethode gestaltet sich wie folgt:

Das unveränderte Phenylglyoxal wird der wässrigen Lösung mit Äther entzogen, nach Verdampfung des Lösungsmittels wird das auskristallisierte Phenylglyoxal in warmem Wasser aufgenommen und mit überschüssiger, gemessener Bisulfitlösung versetzt. Den Bisulfitüberschuss titriert man mit Jod zurück. Man findet, dass z. B. von 0,173 g Phenylglyoxalhydrat, die in 20 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatlösung vom pH 6,5 mit 0,5 g Pankreaspulver bei Zimmertemperatur stehen bleiben nach einer halben Stunde nur noch 0,052 g = 30% vorhanden sind. Ähnliche Ergebnisse zeitigen alle angestellten Versuche auch mit Pankreaslösungen und man findet, dass die in derselben Zeit verschwindenden Mengen Phenylglyoxal für ein und dasselbe Pankreaspräparat den vorhandenen Pankreas-

---

[6] Bioch. Jl. Bd. 19, S. 757 (1925) u. zw. Seite 764.
[7] Doch konnte ich nie eine Blaufärbung konstatieren.

pulvermengen proportional sind. Doch ist das Abwandlungsvermögen der Präparate nicht unbegrenzt. Ein Pankreasauszug vom Trockengewicht 1 g verbraucht maximal etwas über 1 g Phenylglyoxalhydrat. Doch weisen die Analysenresultate bei verschiedenartig vorbehandelten Pankreaslösungen Verschiedenheiten auf, die weiter unten Gegenstand der Besprechung sein sollen. Es sei an dieser Stelle noch mitgeteilt, dass die Gelbfärbung unter sonst gleichen Bedingungen um so intensiver wurde, je alkalischer das Medium war. Der Phenylglyoxalverbrauch war bei gekochten Pankreaslösungen eher stärker als bei nicht gekochten.

Dass es sich hier nicht um einen enzymatischen Prozess handelt, ist klar und geht schon aus den Angaben Fosters hervor. Ein stöchiometrischer Vorgang muss diesen Erscheinungen zu Grunde liegen.

Der zweite Weg, der dazu dienen sollte, den Vorgang der Antiglyoxalasewirkung klarzustellen und die Fostersche Auffassung zu stützen, war präparativer Art. Es sollte der gelbe Stoff isoliert und in seiner Konstitution aufgeklärt werden. Das in Äther aufgenommene Reaktionsprodukt blieb nach dem Verdampfen des Lösungsmittels als rotes Öl zurück. Es gelang nicht, den Körper in einheitlicher kristallisierter Form zu erhalten. Seine Löslichkeitseigenschaften liessen auf ein Gemisch mehrerer Verbindungen schliessen. Es gelang aus diesem Öl einen weissen Körper vom Schmelzpunkt 65° herauszufraktionieren, der aber nicht, wie ich nach dem Schmelzpunkt schliessen konnte, etwa Benzoylameisensäure war, sondern sich als ein ätherlösliches Produkt auswies, das man aus dem Pankreaspulver allein durch Extraktion mit Äther erhalten konnte.[8]

Das Studium der Wirkung des Hemmungskörpers ohne die etwas schwerfällige Kontrolle durch Leberglyoxalase, das eingangs so verheissungsvoll erschien, bot ein äusserst kompliziertes und verworrenes Bild, dessen Unklarheit sich steigerte im Zusammenhalt mit den Befunden, welche das Experiment unter Anwendung der drei Reaktionsteilnehmer, Glyoxalase, Antiglyoxalase, Substrat lieferte. Eine Zusammenfassung aller Versuchsergebnisse unter einen einheitlichen Gesichtspunkt schien unmöglich und liess Zweifel aufkommen an der Bedeutsamkeit des von Foster entdeckten und von mir näher untersuchten Effektes.[9]

[8] Dies war allerdings nach der Darstellungsmethode des Trockenpräparats nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz nicht zu erwarten. (H. S. B. 125, S. 132 und 150, 1923; Bd. 126, S. 143, 1923; Bd. 142 S. 217, 1924.)

[9] Es ist also der Zweifel Fosters an der Angabe Dakins und Dudleys über die Thermolabilität der Antiglyoxalase nicht berechtigt. Thermostabil ist nur die Verunreinigung der Pankreaspräparate.

In der Folgezeit erwies sich dieser Zweifel als durchaus berechtigt. Auf Grund meiner Versuchsergebnisse kann ich folgenden Satz aufstellen: Die Gelbfärbung, das heisst die Veränderung des Phenylglyoxals durch Antiglyoxalaselösungen hat mit der Antiglyoxalasewirkung nichts zu tun.

Der Beweis für diese Behauptung ist zunächst dadurch erbracht, dass jegliche hemmende Wirkung der Antiglyoxalase gegenüber Glyoxalase verschwindet, wenn man die Pankreaslösungen vor dem Zusetzen zur Glyoxalaselösung 20 Minuten lang kocht. Hier sei eines der diesbezüglichen Versuchsergebnisse angeführt.

1. Versuch mit Glyoxalaselösung (Hefeautolysat) allein: — 2,05°
2. „ „ „ + Antiglyoxalase gekocht: — 2,03°
3. „ „ „ + „ nicht gekocht: — 0,69°

Die Versuche sind natürlich unter vergleichbaren Bedingungen angestellt.

Die Fähigkeit, mit Phenylglyoxal einen gelben Körper zu bilden, bleibt jedoch nach dieser Vorbehandlung erhalten.

Mit den Ergebnissen aller Experimente ist folgende Deutung des Effektes vereinbar.: Der rohe Pankreasextrakt enthält Eiweissabbauprodukte der Drüsensubstanz, also Aminosäuren, die je nach der Vorbehandlung der Pankreaslösungen in verschiedenen Mengen schon vorhanden sind oder durch Wirksamwerden der Pankreasfermente nachgeliefert werden können. Alle Einflüsse, welche die Spaltung der Eiweisse begünstigen, fördern also auch das Auftreten der gelben Körper.

In einer Reihe von Modellversuchen fand die Vermutung, dass das Phenylglyoxal sich mit den Aminogruppen der Eiweissabbauprodukte unter Wasseraustritt kondensieren könne, gute Bestätigung.[10] So erhält man gefärbte Niederschläge mit Glykokoll, Anilin, o. Phenylendiamin. Auch Hefe- und animalische Nucleinsäuren verbrauchen Phenylglyoxal. Sie vermögen im kompletten Enzymversuch deshalb auch als Hemmer der Cannizzaroreaktion zu fungieren.

Ich glaube nicht fehl zu gehen, wenn ich eine Erscheinung, die bei Hefeautolysaten zu beobachten war, hierher zähle. Eine Versuchsreihe mit Hefeautolysat und Phenylglyoxal zeigte eine mit steigendem pH zunehmende Gelbfärbung,[11] die schliesslich in orange überging. Auch hier findet wahrscheinlich Konden-

[10] H. D. Dakin und H. W. Dudley bemerken: „it is interesting to note that phenylglyoxal readily combines with histidine arginine, ornithine and lysine to give sparingly soluble jellow substances. (Jl. of Biol. Chem. Bd. 14 1913 S. 156).

[11] S. a. S. 48.

sation von Phenylglyoxal mit Hefeeiweissabbauprodukten statt, die zur Bildung gelbgefärbter Stoffe führt, und zum Teil dafür eine Erklärung liefert, dass mit Glyoxalase nie eine 100-prozentige Umwandung zu Mandelsäure erzielt worden ist.[12]

In zwei Fällen wurden die erhaltenen Körper kristallisiert und analysiert. Der aus Glykokoll und Phenylglyoxalhydrat erhaltene Körper kristallisiert in schönen glänzenden gelben Blättchen, das Kondensationsprodukt aus o. Phenylendiamin bildet gelblichweisse Kristalle.[13]

Das Ausbleiben der Mandelsäurebildung bei Vorbehandlung des Phenylglyoxals mit Pankreaslösungen lässt sich also dadurch erklären, dass das Substrat, bevor die Glyoxalase darauf einwirken kann, durch Verunreinigungen verbraucht worden ist. Doch habe ich hiebei nie wie Foster beobachtet, dass überhaupt keine Mandelsäurebildung auftrat. Es ergab z. B. 20-stündige Einwirkung von Pankreaslösung, entsprechend 0,5 g Trockenpulver, die folgende durch die Vergleichsversuche illustrierte Hemmung.

1. Antiglyoxalase + Substrat 24 Std. bei 30° inkubiert — 0,78°
2. Derselbe Versuch jedoch ohne Pankreaslösung — 2,86°
3. Substrat- Pankreaslösung und Phenylglyoxal gleichzeitig angesetzt — 1,04°

Der grösste Teil der unter 1. ersichtlichen Hemmung ist noch auf die in 3. sichtbar werdende Wirkung der Antiglyoxalase auf die Glyoxalase zu beziehen, sodass der Hemmungseffekt, der durch die Einwirkung der Pankreaslösung auf das Substrat hervorgerufen wird, nicht entfernt die von Foster angegebene Höhe erreicht. Doch kann die durch Foster beobachtete vollständige Hemmung auf Anwendung grosser Pankreaspulvermengen und geringe Substratkonzentrationen zurückgeführt werden. Auch waren die Inkubationszeiten grösser und die Versuchstemperatur höher als in meinen Versuchen. Hier war die Substratkonzentration immer so hoch, dass auch ein Abfangen verhältnismässig grosser Substratmengen eine Mandelsäurebildung nicht ganz verhindern konnte. In Versuchen mit geringer Inkubationsdauer Antiglyoxalase-Substrat tritt die Hemmung gegenüber dem Vergleichsversuch nicht hervor.

[12] Während Phenylglyoxal sich spielend z. B. mit Glykokoll oder o. Phenylendiamin in wässriger Lösung bei gewöhnlicher Temperatur kondensiert, reagiert Methylglyoxal unter denselben Versuchsbedingungen nicht. Der unspezifische Phenylglyoxalverbrauch durch Hefeautolysate könnte genau wie der Substratverbrauch durch Pankreaslösungen in gekochten Hefeautolysaten titrimetrisch bestimmt werden.

[13] Siehe S. 33 u. 34.

Die vorgetäuschte spezifische Wirkung der Antiglyoxalase auf das Substrat der Ketoaldehydmutase ist somit auf verunreinigende Begleitstoffe der rohen Pankreaslösung zurückgeführt.

Somit stehen nur noch zwei Reaktionsmechanismen der Antiglyoxalasewirkung zur Diskussion. Diese sollen nun gemeinsam besprochen werden.

Eines der Hauptmerkmale eines idealen Enzyms ist seine Fähigkeit, die im Bereich seiner Spezifität liegende Reaktion ohne Einbusse seiner katalytischen Fähigkeit zu beschleunigen. Wenn also die Antiglyoxalase die Fähigkeit besitzt, beliebige Glyoxalasemengen zu inaktivieren, so ist sie zusammen mit ihren übrigen Eigenschaften als Ferment gekennzeichnet. Wäre dagegen das Hemmungsvermögen der Antiglyoxalase beschränkt, käme also die Hemmung regelmässig nach einer gewissen Zeit zum Stillstand, so hätten wir es nicht mit einem Enzym zu tun.

Ähnliche Überlegungen wie die soeben angestellte spielten eine grosse Rolle in den zahlreichen Arbeiten über den Aktivator des Trypsins, die Enterokinase. Der Arbeit von E. Waldschmidt-Leitz, der 5. Abhandlung über Pankreasenzyme von Willstätter und Mitarbeitern[14] entnehme ich folgende diesbezügliche Stellen: . . . Schepowalnikoff . . . fand . . . dass die Aktivierung des Trypsins eine gewisse Zeit benötige und dass der Aktivator durch Kochen zerstört würde . . . Hieraus schloss er auf einen fermentativen Vorgang. . . . Zwei prinzipiell verschiedene Anschauungen über den Mechanismus der Kinasewirkung stehen sich gegenüber, die Fermenttheorie und die Komplementtheorie. Die erste wird durch Bayliss und Starling vertreten . . : Die geringste Spur Enterokinase vermag eine grosse Menge Trypsinogen in Trypsin zu verwandeln . . . dieses ist eine neue Substanz . . . gebildet aus Trypsinogen durch die enzymatische Wirkung der Enterokinase. Dagegen standen besonders Hamburger und Heckma . . : Eine bestimmte Menge Darmsaft soll nur eine bestimmte Menge Zymogen umwandeln. Daraus schliessen sie auf eine chemische Reaktion in stöchiometrischem Verhältnis. Die Arbeiten von Waldschmidt-Leitz entschieden zu Gunsten der zweiten Anschauung: „Die Kinase erreicht unabhängig von ihrer Menge die dieser entsprechende Höchstleistung (der Aktivierung) nach etwa 30 Minuten“[15]

In diesen wenigen Sätzen ist der Weg vorgezeichnet, der auch zur Aufklärung der Natur der Antiglyoxalasewirkung führen kann.

---

[14] H. S. Bd. 132, S. 181 (1923—24) u. zw. S. 182. 184. 185.
[15] H. S. Bd. 132, S. 181 (1923—24) u. zw. S. 235.

Es ist zunächst festzustellen, ob die Inaktivierung der Ketoaldehydmutase zeitlich bedingt ist. H. D. Dakin und H. W. Dudley hatten die Beobachtung gemacht, dass die Hemmung um so grösser war, je länger sie die Glyoxalaselösung mit Antiglyoxalaselösung vor der Zugabe des Substrats stehen liessen.[16] Diese Herabsetzung der Aktivität der Glyoxalase ist nun nicht auf Abnahme der Wirksamkeit beim längeren Stehen des Enzyms für sich zu erklären, da ja die Versuchsanordnung so gewählt ist, dass sämtliche Versuche zu gleicher Zeit durch die Zugabe des Substrats fertiggestellt werden.

Dieser Dakinsche Inkubationseffekt wurde von mir voll bestätigt.

Hiezu folgendes Beispiel:

1. Versuch ohne Hemmung — 3,25°
2. Die 3 Reaktionsteilnehmer zu gleicher Zeit zus. gegeb. — 1,61°
3. Nach 3-stündig. Inkubation Glyoxalase-Antiglyoxalase wird das Substrat zugegeben — 1,03°

Die 3 Versuche wurden jeweils zu gleicher Zeit angesetzt.

Es ist also die Glyoxalaseinaktivierung durch Antiglyoxalase eine Zeitreaktion. Diese muss aber nicht enzymatischer Natur sein, dies wäre erst dann erwiesen, wenn die Reaktion der Inaktivierung unabhängig von der Antiglyoxalasemenge immer zur vollständigen Hemmung führen würde. H. D. Dakin und H. W. Dudley haben versucht mit verhältnismässig kleinen Pankreatinmengen 0,05 bezw. 0,035 g vollständige Hemmung zu erzielen. Diese trat für 50 ccm 20-prozentigen Leberauszug ein nach etwa 4—5-stündiger Inkubation. Diese Versuche sind jedoch nicht ein Beweis für die Enzymnatur der Antiglyoxalase. Solche Leberauszüge, wie sie zu diesen Versuchen angewandt wurden, enthalten in nicht weiter gereinigter Form unter Umständen nur 0,66% Trockengewicht. Für 50 ccm wären es also 0,33 g, wovon sicher nur ein ganz kleiner Bruchteil auf das Glyoxalasemolekül fällt. Mithin ist die angewandte Pankreatinmenge gegenüber der Glyoxalase noch eine verhältnismässig grosse. Die Beurteilung der Frage, ob es sich bei der Glyoxalaseinaktivierung um eine stöchiometrische oder um eine Enzymreaktion handelt, ist durch die grossen Inkubationszeiten erschwert. Viel günstiger als hier lagen die Umstände für die Deutung der Verhältnisse bei der Aktivierung von Papain und Trypsin, wo mit Blausäure bezw. Enterokinase schon nach einer Stunde bezw. halben Stunde maximale Aktivierung erreicht ist. Solange die beiden Enzymlösungen in ungereinig-

[16] l. c. 4.

ter Form angewandt werden müssen, bleibt eine Entscheidung über die Antiglyoxalasenatur auf diesem Wege schwierig.

Auf eine zweite Weise hat Waldschmidt-Leitz die Frage nach der Natur der Enterokinasewirkung entschieden; „Durch Adsorption mit Tonerde aus saurer Lösung ist es gelungen, bereits aktivem Enzym einen Teil seines Aktivators zu entziehen und es so in der Adsorptionsrestlösung erneut in inaktive, aktivierbare Form überzuführen."[17]

Wenn der Mechanismus der Inaktivierung der Glyoxalase derselbe ist, wie der bei der Aktivierung des Trypsins, so ist nicht ausgeschlossen, dass die Glyoxalase-Antiglyoxalaseverbindung wieder zerlegt werden kann und so die Glyoxalase in aktiver Form wieder zurückerhalten werden kann. Wie es für die Trypsin-Aktivatorverbindung möglich war, wollte ich die eventuellen Bindungsaffinitäten der Glyoxalase-Paralysatorverbindung durch Adsorptionsaffinitäten überwinden und habe bei dem Studium des Adsorptionsverhaltens von Glyoxalase und Antiglyoxalase Möglichkeiten für die Trennung derselben gesucht. Solche günstigen Bedingungen konnte ich zwar ausfindig machen, aber keine Versuchsergebnisse erhalten, die mir es erlaubten, definitive Aussagen zu machen. Die Trennung sollte darauf beruhen, dass Glyoxalase und Antiglyoxalase in essigsaurer Lösung an Kieselsäure und an Tonerde adsorbiert werden, in beiden Fällen aber nur Glyoxalase eluierbar ist. Die Versuchsanordnung war folgende.

1. Hauptversuch: Glyoxalase und Antiglyoxalase werden inkubiert, nach zweistündiger Inkubation an $SiO_2$ bezw. $Al(OH)_3C\gamma$ adsorbiert und daraus Glyoxalase eluiert.

2. Vergleichsversuch I. Unter den Aciditätsbedingungen des Hauptversuches wird Antiglyoxalase allein adsorbiert und eluiert.

3. Vergleichsversuch II. Unter den Aciditätsbedingungen des Hauptversuchs wird die dort angewandte Menge Glyoxalase allein adsorbiert und ebenso wie dort eluiert. Der Hauptversuch, sowie der Kontrollversuch II wird durch Zusatz von Substrat und Puffer, der Kontrollversuch I durch Zusatz von Substrat, Glyoxalaselösung und Puffer fertiggestellt.

Die Elutionen fielen in der mit Tonerde als Adsorbens angestellten Versuchsreihe negativ aus, in der mit Kieselsäure durchgeführten Reihe konnte beim Kontrollversuch II Glyoxalase eluiert werden. Beim Hauptversuch dagegen fiel die Elution negativ aus. Da aber die eluierte Glyoxalasemenge sehr gering war, kann ich aus diesem Versuchsergebnis keine Schlüsse ziehen.

---

[17] H. S. Bd. 132, S. 181 (1923—24) u. zw. S. 235.

Ferner wurden Trennungsversuche vorgenommen, die sich auf die Beobachtung stützen, dass die in essigsaurer Lösung von Kieselsäure aufgenommene Glyoxalasemenge nur etwa der Hälfte der vorhandenen entspricht, dass aber die Aufnahme von Antiglyoxalase unter diesen Bedingungen quantitativ erfolgt. Die Versuche wurden so ausgeführt, dass einmal nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten ein ander Mal nach 120 Minuten aus dem Gemisch der Lösungen Glyoxalase-Antiglyoxalase, die Antiglyoxalase an Kieselsäure adsorbiert wurde. Die Mutterlaugen wurden dann gepuffert und mit Substrat versetzt. Zwei Kontrollversuche geben an, wieviel Mandelsäure ohne Hemmung und wieviel mit Hemmung, jedoch ohne Inkubation, gebildet wurde.

1. Kontrollversuch ohne Hemmung — 2,99 0
2. Sämtliche Reaktionsteilnehmer gleichz. zus. gegeb. — 0,89 0
3. Mutterlauge der Adsorption an $SiO_2$ nach 5 Min. Inkub. — 0,14 0
4. „ „ „ „ „ „ 120 „ „ „ — 0,06 0

Es müssten die Versuche 3 und 4 viel höhere Mandelsäurebildung aufweisen wie der Versuch 2, wenn es möglich wäre, auf die versuchte Weise die eventuelle Glyoxalase-Antiglyoxalaseverbindung zu zerlegen. Es könnte jedoch aus diesen Versuchen auch gefolgert werden, dass es sich eben nicht um eine reversible Inaktivierung der Glyoxalase durch einen stöchiometrisch wirkenden Paralysator, sondern um eine irreversible Zerstörung der Glyoxalase durch denselben handelt.

Die Antiglyoxalasewirkung kommt nach H. W. Dakin und H. W. Dudley[18] keinem der bekannten Enzyme des Pankreas zu. Nach diesen Autoren ist Papajotin ohne Wirkung auf Glyoxalase; ebenso die Diastase des Mundspeichels. Lipase ist in den Leberauszügen selber in grossen Mengen enthalten. R. Kuhn und R. Heckscher[19] konnten Trypsin und Antiglyoxalase trennen und stellten ferner fest, dass reine Insulinpräparate frei von Antiglyoxalase sind, Insulin also ebenfalls nicht für die Antiglyoxalasewirkung verantwortlich ist.

Das Problem der Glyoxalaseinaktivierung durch Antiglyoxalase bleibt vorläufig ungelöst.

## III. Bedeutung der Antiglyoxalase.

Soweit H. D. Dakin und H. W. Dudley[20] geprüft haben, kommt die Antiglyoxalase in den Bauchspeicheldrüsen aller höheren Tiere

[18] l. c. 4.
[19] H. S. Bd. 160, S. 166 (1926) und 161.
[20] l. c. 4.

vor. Sie vermag die glyoxalatische Wirkung nicht nur der Leberextrakte, sondern auch die der verschiedensten Auszüge aus tierischen Geweben zu hemmen. Diese Tatsache führte Dakin und Dudley zu der Vermutung, dass die Antiglyoxalase ein Produkt der inneren Sekretion sei und ihr eine Bedeutung im Kohlehydratstoffwechsel zukomme,[21] doch haben diese Autoren die Antiglyoxalase nur in der Bauchspeicheldrüse selber und im Pankreassaft nachweisen können. Ein Stoff, der in den Verdauungstrakt geschickt wird, kann schwerlich eine Funktion im Kohlehydratstoffwechsel ausüben. Das Insulin wird den Geweben auf lymphatischem Wege zugeführt. Es ist möglich, dass auch die Antiglyoxalase auf diesem Wege zu den Geweben gelangt.

Dakin und Dudley haben geprüft, ob die Exstirpation des Pankreas für den Glyoxalasegehalt des Blutes und der Gewebe von Bedeutung sei und entgegen ihrer Vermutung gefunden, dass, „. . . . while the blood of glycosuric dogs is not changed from normal, the blood and tissues of human diabetics and of depancreatized dogs have somewhat less than the normal activity. It is curious that the removal from an animal of the organ which exerts so profound an inhibitory effect upon the action of glyoxalase should be followed by decrease rather than an increase in the activity of the latter enzyme."

Ich habe, um zu entscheiden ob der Antiglyoxalase innersekretorische Bedeutung zukomme, untersucht, ob die Lymphe des Ductus thoracicus, des zweiten Ausführungsganges der Bauchspeicheldrüse, Antiglyoxalase enthält. Ferner habe ich den Bauchspeichel auf seinen Gehalt an Antiglyoxalase untersucht.

Die zur Gewinnung von Ductuslymphe und Bauchspeichel notwendigen Operationen wurden an Hunden in der Universitätsklinik zu Zürich ausgeführt. Herrn Professor Clermont danke ich an dieser Stelle für die gefällige Überlassung der Versuchstiere und Herrn Oberarzt Dr. Winterstein für die Ausführung der Operationen.

Zur Gewinnung der Ductuslymphe wurde eine Ductus-thoracicus-Fistel,[22] zur Gewinnung von Bauchspeichel eine Pankreasfistel[23] angelegt.

Die Versuche wurden wie die übrigen Hemmungsversuche mit Pankreasauszügen durchgeführt. Der Hauptversuch enthielt eine

[21] Jl. of Biol. Chem. Bd. 16, S. 505 (1913) und zw. S. 506.

[22] Die Methodik der Operation ist beschrieben in „American Journal of the medical Sciences" Bd. 165, (1923) S. 480.

[23] Ausgeführt nach der Vorschrift: Pankreasexstirpation und Pankreasdauerfistel in Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden Abt. IV, Teil 6, 2. Hälfte Heft 12 (Lief. 215) S. 1136.

bestimmte Menge Ductuslymphe, ein Parallelversuch zur Erhaltung vergleichbarer Verhältnisse dieselbe Menge Lymphe gekocht.

Die Versuche zeigen, dass die Lymphe des Ductus thoracicus frei ist von Antiglyoxalase. Es ergab z. B. ein Versuch mit 7 ccm Hundelymphe und Leberglyoxalase eine Drehung von — 3,60° und derselbe Ansatz mit gekochter Lymphe —3,50°. Es wäre interessant, zu untersuchen, in welchem Teil des Pankreasgewebes die Antiglyoxalase produziert wird, ob etwa die Langerhans'schen Inseln Produktionsstätten sind, wie sie es für das Insulin bedeuten oder ob die Antiglyoxalase im acinösen Gewebe erzeugt wird.[25]

Die Untersuchung mit klarem Bauchspeichel wurde genau so ausgeführt wie die mit Lymphe. Die Hauptversuche enthielten den Bauchspeichel in frischem Zustand, die Vergleichsversuche dieselbe Menge Bauchspeichel gekocht. Es vermochten z. B. 10 ccm Bauchspeichel ohne vorherige Inkubation die Wirksamkeit einer Glyoxalaselösung auf $^2/_3$ des ursprünglichen Wertes herabzusetzen. Die Versuche zeigen also, dass der Bauchspeichel Antiglyoxalase enthält. Somit werden die Angaben Dakins bestätigt.

Mit diesen Feststellungen scheint mir die Vermutung Dakins, dass der Antiglyoxalase innersekretorische Bedeutung zukomme, nicht zu Recht zu bestehen.

## IV. Antiglyoxalase und Hefenglyoxalase.

Die Antiglyoxalase vermag die tierischen Glyoxalasen zu inaktivieren, ob sie aber auch Ketoaldehydmutasen anderer Herkunft zu hemmen vermag, ist von vornherein nicht zu sagen.

Ich habe untersucht, ob Pankreasauszüge die Glyoxalasen der Hefen zu hemmen vermögen. Zu den Versuchen wurden Hefenautolysate und Frischhefe verwendet. Sie wurden ausgeführt wie es für Leberenzym im experimentellen Teil geschildert ist. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass die Glyoxalasen der Hefeautolysate durch Schweinepankreasauszüge stark gehemmt werden.

Beispiel: 20 ccm Bastautolysat, entsprechend 5 g Frischhefe + 0,5 g Pankreaspulver $\alpha_D^{20}$: — 0,14°. 20 ccm Bastautolysat ohne den Zusatz des Hemmungskörpers $\alpha_D^{20}$: — 1,63°.

Doch nicht nur das in Lösung befindliche Enzym der Hefe wird gehemmt, sondern auch das zellstrukturgebundene der Frischhefe. Es wird die interessante Feststellung gemacht, dass die Antiglyoxalase durch die Hefezelle hinein zu der Glyoxalase vordringt und diese inaktiviert.

[25] Dies könnte an den isolierb. Inseln einiger Knochenfische geprüft werden.

Beispiel: 5 g Frischhefe Olten + 10 ccm Antiglyoxalaselösung ergeben ein $\alpha_D^{20}$ von — 1,11°. Dieselbe Menge Hefe ohne den Hemmungskörper ergibt ein $\alpha_D^{20}$ von — 1,74°.

## V. Vermag Antiglyoxalase die Milchsäuregärung zu hemmen?

Die beim Hexosenabbau im Muskel auftretende Milchsäure entsteht aus Methylglyoxal durch die Wirkung der Ketoaldehydmutase. Seit Neuberg und Mitarbeiter dieses Ferment auch in Milch- und Essigsäurebakterien gefunden haben, ist es zur Gewissheit geworden, dass auch die Bakterien die Kohlehydrate über Methylglyoxal zu Milchsäure abbauen. Für eben diese Dismutation Methylglyoxal-Milchsäure ist die Antiglyoxalase ein sehr intensiver Hemmungskörper.

G. Winfield und F. G. Hopkins[26] haben gefunden, dass Pankreasauszüge die Glykolyse von Muskelgewebe zu hemmen vermögen. Nach den Untersuchungen von D. L. Foster u. C. E. Woodrow[27] ist es jedoch nicht wahrscheinlich, dass dieser Hemmungskörper für die spontane Milchsäurebildung im Muskel identisch mit der Antiglyoxalase ist. Doch sind die dafür geltend gemachten Gründe (z. B. verschiedene Resistenz gegenüber Alkali) nicht ganz entscheidend und D. L. Foster lässt die Frage, ob der Körper, der die Hemmung der Glykolyse bewirkt, verschieden ist von der Antiglyoxalase, noch offen.

Es lag nahe zu untersuchen, ob auch die Milchsäuregärung der Milchsäurebakterien durch Antiglyoxalase gehemmt wird. In Vorversuchen wurden einige Gärungen unternommen mit Bacterium lactis aerogenes, Lactobacillus, Bacterium coli und mit Bacterium acidi lactici Hüppe. Dabei wurde festgestellt, dass diese vier Mikroben aus Glukose inaktive Milchsäure bilden. Nach den schönen Untersuchungen von R. O. Herzog und Hörth[28] ist die Konfiguration der bei den Gärungen entstehenden Milchsäure abhängig einzig von dem gewählten Bacterium, nicht vom Substrat.

Der Hemmungsversuch wurde ausgeführt mit einer auf Agar gezüchteten Reinkultur von B. acidi lactici Hüppe. Für den Versuch wurden die Bakterien mit destilliertem Wasser abgeschlämmt.

---

[26] Jl. of Physiol. 50.
[27] Bioch. Journ. Bd. 18, S. 562 (1924).
[28] H. S. Bd. 60, S. 131.

Zu gleichen Mengen einer Aufschlämmung der Bakterien wurde Pankreasauszug zugegeben, einmal gekocht und einmal nicht gekocht und mit 1-prozentiger Glukoselösung über Nacht bei 30° belassen. Die Sistierung der Milchsäurebildung geschah mit 25-prozentiger Phosphorsäure. Die Milchsäure wurde nach E. Ohlson[29] isoliert und nach Fürth und Charnass quantitativ bestimmt. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass keine Hemmung der Milchsäuregärung durch Antiglyoxalase eintritt.

Die im Hemmungsversuch erzeugte Milchsäuremenge betrug 182,7 mg, die im Vergleichsversuch erzeugte Milchsäuremenge betrug 185,8 mg. Die beiden Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen der Methode überein.

Dass keine Hemmung der Milchsäure zu konstatieren ist, kommt nach meiner Meinung daher, dass die Antiglyoxalase nicht in die Bakterienzelle zur Glyoxalase vordringen kann. Ich bin der Ansicht, dass alle Glyoxalasen, die aus der Zelle herausgelöst werden können, durch Antiglyoxalase inaktivierbar sind. Die Bakterienenzyme sind so stark zellstrukturgebunden, dass man sie nie ausserhalb der Zelle hat beobachten können.

## VI. Antiglyoxalase und Carcinomstoffwechsel.

Die fundamentale Entdeckung Meyerhofs, welche die Beziehung zwischen aerobem und anaerobem Zuckerabbau klargestellt hat, ist neuerdings für die Krebsforschung von grösster Bedeutung geworden. Meyerhof hat gezeigt, dass die in der anaeroben Phase des Kohlehydratabbaus entstehenden 3 C-Körper in der aeroben Phase unter teilweiser Oxydation zu Glykogen synthetisiert werden, sodass normalerweise in den Geweben keine Milchsäure persistiert.

Bei der Carcinomzelle hat man neben der Atmung eine starke Milchsäuregärung festgestellt. Die Krebszelle produziert pro Stunde ein Zehntel ihres Eigengewichtes an Milchsäure. Im Sinne der Meyerhofschen Theorie heisst das, dass die in der normalen Zelle in der aeroben Phase verschwindenden 3 C-Körper in der Krebszelle zum grössten Teil zu Milchsäure stabilisiert werden. O. Warburg hat gezeigt, dass der Zellstoffwechsel der normalen Zelle in der Erstickung gleich dem normalen Stoffwechsel der Carcinomzelle ist; auch hier findet eine starke Milchsäuregärung statt.

---

[29] Skandinav. Arch. f. physiol. 33, 231 (1916), Chemisches Zentralblatt 1916 II, Seite 172.

Es ist also in der Carcinomzelle das Atmungssystem gestört und nach O. Warburg[30] kann jede chronische Schädigung, die nicht stark genug ist Zellen zu töten, Krebs erzeugen.

Die Anaerobiose führt von der Hexose zum Methylglyoxal. Dieses wird in der Hefezelle weiter abgebaut, in der normalen Muskelzelle unterliegt es der Meyerhofschen Reaktion und in der Carcinomzelle wird es wie in der Bakterienzelle zu Milchsäure dismutiert.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Milchsäurebildung der Carcinomzelle durch Antiglyoxalase gehemmt werden kann. Freilich wäre es zur experimentellen Prüfung dieser Frage nicht statthaft die rohen Antiglyoxalaselösungen zu verwenden, weil durch ihren Fermentreichtum — es sind die stark wirksamen Fermente der Bauchspeicheldrüse darin enthalten — die zu untersuchenden Zellen zerstört würden. Für eine solche Untersuchung wäre ein hochwertiges Antiglyoxalasepräparat, frei von allen Enzymen des Pankreas und frei von Eiweiss, sehr erwünscht.

## VII. Beschreibung der Versuche.

### 1. Zur quantitativen Bestimmung des Phenylglyoxals.

Ein Mol Phenylglyoxal kondensiert sich mit einem Mol Bisulfit zu einer stabilen Aldehydbisulfitverbindung. Diese ist auch in verdünnten Lösungen praktisch undissoziiert, d. h. es lässt sich bei der Rücktitration des überschüssigen Bisulfits mit Jod genau feststellen, wann das überschüssige Bisulfit oxydiert ist. Von dem Endpunkt der Titration bis zum Verbrauch eines weiteren Tropfens Jod vergehen einige Minuten.

Ausführung der Bestimmung: Phenylglyoxalhydrat wird in Mengen von 40 — 250 mg in ca. 50 ccm Wasser aufgenommen, mit der doppelten Menge des zu erwartenden Bisulfitverbrauchs mit 0,1 normaler Natriumbisulfitlösung versetzt und 45 Minuten in Eis aufbewahrt. Darnach wird mit 0,1 normalem Jod und Stärke als Indikator rasch auf hellblau titriert. Der Titer der Bisulfitlösung wird jeweils in einer Parallelbestimmung, die genau wie die Hauptbestimmung ausgeführt wird, ermittelt.

Für die Ausrechnung gilt folgendes: Nach der Theorie verbrauchen 152,06 g Phenylglyoxalhydrat 20000 ccm 0,1 normales Bisulfit also entsprechen einem Bisulfitverbrauch von 1 ccm 7,60 mg Phenylglyoxalhydrat.

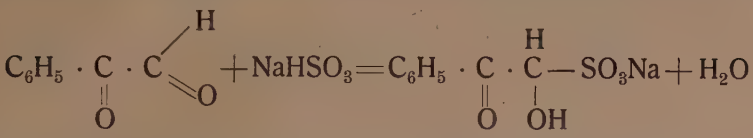
---

[30] Vortrag: Über den Stand des Carcinomproblems. Die Naturwiss. 1927, S. 1.

Für Phenylglyoxal vom Schmelzpunkt 73° (verschiedene Präparate) finde ich folgende Werte:

| Phenylglyoxalhydrat angewendet (mg) | 0,1 n $NaHSO_3$ Verbrauch | % der Theorie gefunden |
|---|---|---|
| 250,0 | 15,80 | 95,9 |
| 38,3 | 4,95 | 98,5 |
| 77,0 | 10,09 | 95,0 |

Phenylglyoxal bindet nach 18-stündigem Stehen mit Natriumbisulfit dieselbe Menge Bisulfit wie nach 45 Minuten. Da der nach 45 Minuten erhaltene Wert auf die Gleichung stimmt



vermag 1 Mol Phenylglyoxal nur 1 Mol Bisulfit zu binden.

## 2. Ausführung der Bestimmung des Phenylglyoxals bei der Reaktion mit Pankreaslösungen.

Das Phenylglyoxal wird durch 4 bis 5-maliges Ausschütteln der Reaktionslösung mit insgesamt 75 ccm Äther derselben entzogen. Die ätherische Lösung wird nach dem Trocknen mit entwässertem Natriumsulfat in ein 250 ccm-Erlenmeyerkölbchen quantitativ übergeführt, das Natriumsulfat viermal mit insgesamt 20 ccm trockenem Äther nachgewaschen. Nun wird der Äther verdampft, das auskristallisierte Phenylglyoxal samt den eventuell vorhandenen Verunreinigungen in warmem Wasser aufgenommen und nach der oben gegebenen Vorschrift titrimetrisch bestimmt. Das Pankreaspulver enthält nach einer in der hier beschriebenen Weise ausgeführten Bestimmung keine nennenswerten Mengen bisulfitbindender Substanz.

## 3. Bereitung der Pankreaslösungen.

0,5 g Pankreastrockenpulver, welches nach der Vorschrift von R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz[31] bereitet wurde, werden in 20 ccm 1-prozentige Natriumbikarbonatlösung eingetragen und

[31] l. c. 8.

mehrere Stunden auf der Maschine geschüttelt. Darauf wird von dem Ungelösten abzentrifugiert und die trübe Lösung mit Toluol überschichtet. Für die einzelnen Versuchsreihen wurden die Lösungen immer frisch bereitet.

Die Bestimmung des Trockengewichtes der organischen Substanz der Pankreaslösungen wird folgendermassen vorgenommen: 10 ccm des Bikarbonatauszugs werden bei 105° zur Trockne verdampft und der Rückstand gewogen. Eine bestimmte Menge desselben wird mit konzentrierter Schwefelsäure abgeraucht, geglüht und gewogen. Aus der gefundenen Menge Natriumsulfat berechnet sich der Bikarbonatgehalt des Trockenrückstandes. Das Gewicht des in 10 ccm vorhandenen Bikarbonats wird vom gefundenen Trockengewicht subtrahiert.

## 4. Inkubationsversuche.

### a) Phenylglyoxal-Antiglyoxalase.

Substratlösung und Bikarbonatauszug werden zusammengegossen und bei 30° inkubiert. Für die Aufarbeitung der Inkubationsversuche stehen zwei Wege zur Verfügung. Erstens das Phenylglyoxal wird vor und nach der Inkubation titrimetrisch bestimmt. Zweitens nach der Inkubation wird das Reaktionsgemisch gleichzeitig mit einem Parallelversuch mit der Inkubationszeit Substrat Antiglyoxalase 0 Minuten mit Glyoxalaselösung angesetzt und die in beiden Fällen gebildete Mandelsäure polarimetrisch bestimmt.

Versuchsbeispiel zu erstens: 10 ccm Phenylglyoxallösung + 15 ccm Bikarbonatauszug entsprechend 1,85 g Pankreastrockenpulver werden 3,5 Stunden bei 30° belassen, ebenso 10 ccm Phenylglyoxallösung + 15 ccm $\frac{n}{20}$ Bikarbonatlösung. Darnach werden beide Lösungen ausgeäthert und die noch vorhandenen Mengen Phenylglyoxal bestimmt.

Inkubationsversuch nach 3,5 Stunden 32 mg Phenylgl. noch vorh.
Kontrollversuch „ „ „ 287 „ „ „ vorhanden.

In Tabelle I sind weitere in der eben beschriebenen Weise durchgeführte Versuchsbeispiele aufgeführt. Temperatur 30°. Menge des angewandten Substrats 300 mg.

Tabelle I.

| Angewandte Antiglyoxalasemenge entspr. g Trockengewicht | Inkub.-dauer Std. | Phenylglyoxalhydr. noch vorhanden im Kontrollvers. | im Hauptver. |
|---|---|---|---|
| 20 ccm = 2,5 | 0,5 | 158 | 42 |
| 15 „ = 1,85 | 3,0 | 173 | 53 |
| 2 „ = 0,5 | 4,5 | 240 | 191 |
| 2 „ = 0,5 | 16,0 | 240 | 166 |
| 0,4 „ = 0,1 | 1,5 | 240 | 227 |
| 0,4 „ = 0,1 | 16,0 | 240 | 213 |

Aus den Angaben der Tabelle ersieht man, dass die gebundene Phenylglyoxalmenge proportional der angewandten Antiglyoxalasemenge ist, dass die gebundene Menge mit der Inkubationsdauer zunimmt.

Um die Schiffsche Base[32] zu spalten, wurde der Inkubationsversuch mit 5 ccm 25-prozentiger Phosphorsäure angesäuert und einige Zeit erwärmt. Bei 60° wurden auf diese Weise von 76 mg gebundenem Phenylglyoxalhydrat 7 mg zurückerhalten und bei Siedetemperatur von 118 mg 53 wieder gewonnen. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass das Pankreaspulver das Phenylglyoxal zu einer Schiffschen Base kondensiert.

In Tabelle II sind Versuche zusammengestellt, in denen verschiedene Körper auf ihre Fähigkeit Phenylglyoxal zu binden geprüft wurden. Die Aufarbeitung ist genau wie für die Inkubationsversuche beschrieben, ausgeführt.

Substratmenge 300 mg, Temperatur 30°.

Tabelle II.

| Angewandter Körper | Inkub.-dauer | Phenylglyoxal noch vorhanden im Leervers. | im Inkubat. Vers. |
|---|---|---|---|
| Anilin 0,5 g | 3 Std. | 287 mg | 0,0 mg |
| o. Phenylendiamin 0,5 „ | 3 „ | „ | 0,0 „ |
| Clupein 0,2 „ | 2 „ | „ | 284 „ |
| Tier. Nucleins. E. Merck. 0,5 „ | 3 „ | „ | 190 „ |
| Hefenulcleins. E. Merck. 0,5 „ | 3 „ | „ | 194 „ |

[32] s. S. 8.

Dass auch gekochte Pankreaslösungen fähig sind mit Phenylglyoxal gelbe Körper zu bilden, zeigen die folgenden Versuche. Temperatur 30°.

Tabelle III.

| Angew. Antiglyoxalasemenge | Inkub.-dauer Std. | Phenylgl. noch vorhanden im Leervers. mg | Phenylgl. noch vorhanden im Inkub. Vers. mg |
|---|---|---|---|
| 10 ccm Bik. Ausz. entspr. 0,5 g Trockenpulver Kochdauer 25 Minuten. | 2 | 97,9 | 49,2 |
| 10 ccm Bik. Ausz. entspr. 0,5 g Trockenpulver nicht gekocht. | 2 | 97,8 | 44,3 |
| 10 ccm Bik. Ausz. entspr. 0,6 g Trockenpulver Kochdauer 25 Minuten | 0,75 | 147,8 | 43,1 |
| 10 ccm Bik. Ausz. entspr. 0,6 g Trockenpulver nicht gekocht. | 0,75 | 147,8 | 57,0 |

Bei allen Versuchen mit Ausnahme der Leerversuche trat eine rotgelbe Färbung auf, die namentlich bei Versuchen mit hohem pH intensiv war. Die Farbe der Kochversuche unterschied sich nicht von derjenigen der Versuche mit nicht gekochter Pankreaslösung.

Versuchsbeispiele zu zweitens: 10 ccm Phenylglyoxallösung entsprechend 0,3 g Substrat werden mit 30 ccm Pankreaslösung entsprechend 0,4 g Trockenpulver 20 Stunden inkubiert. Danach wird durch Zusatz von 70 ccm Leberenzym und 30 ccm Phosphatpuffer pH 7,5 die Reaktion eingeleitet. Zwei Parallelversuche, in welchen die einzelnen Reaktionskomponenten, also Phenylglyoxallösung und Pankreaslösung bei gleichen Bedingungen wie im Hauptversuch, vor Fertigstellung aller Versuche, welche zu gleicher Zeit erfolgte, aufbewahrt wurden, geben darüber Aufschluss, wieviel Mandelsäure gebildet wird, wenn Phenylglyoxal, Antiglyoxalase und Leberenzym zu gleicher Zeit aufeinanderwirken, also bei Inkubationszeit 0 und wieviel Mandelsäure ohne Antiglyoxalase entsteht. Reaktionsdauer 18 Stunden. Temperatur 30°.

1. Inkubationsversuch, Inkub. Dauer 20 Std. $\alpha_D^{20} - 1{,}23^0$
2. Versuch, Inkub. Dauer 0 Std. $\alpha_D^{20} - 1{,}71^0$
3. Parallelversuch ohne Antiglyoxalase $\alpha_D^{20} - 3{,}82^0$

Zweites Versuchsbeispiel:

1. Inkubationsversuch, Inkub. Dauer 24 Std. $\alpha_D^{20} - 0{,}78^0$
2. Versuch, Inkub. Dauer 0 Std. $\alpha_D^{20} - 1{,}04^0$
3. Parallelversuch ohne Antiglyoxalase $\alpha_D^{20} - 2{,}86^0$.

Kinetik der Phenylglyoxalbindung durch die Pankreaslösungen. 20 ccm Bikarbonatauszug vom Trockengewicht 0,2638 g werden mit 50 ccm Phenylglyoxallösung entsprechend 0,6075 g Substrat bei 30° stehen gelassen. Ein in gleicher Weise angestellter Leerversuch enthält 20 ccm 1-prozentige Bikarbonatlösung, dieselbe Menge Substrat im gleichen Volumen wie im Hauptversuch. Zu den angegebenen Zeiten werden aus den beiden Reaktionslösungen je 20 ccm entnommen und das darin enthaltene Phenylglyoxal titrimetrisch bestimmt.

| Inkubationsdauer (Min.) | | Phenylglyoxal noch vorhanden mg | |
|---|---|---|---|
| Hauptvers. | Leervers. | Hauptvers. | Leervers. |
| 50 | 50 | 0,1285 | 0,1322 |
| 1140 | 1140 | 0,0642 | 0,1230 |
| 2400 | 2400 | 0,0425 | 0,1108 |

Die Bindungsfähigkeit der Pankreaslösung hat nach etwa 1200 Minuten ihr Maximum erreicht. Die weitere Abnahme des Substrates ist wie die im Leerversuch auf OH-Ionenwirkung zurückzuführen. Nimmt man dennoch den bei 2400 Minuten gefundenen Wert für das Substrat als Endwert an, so berechnet sich an Hand der Daten des Vergleichsversuchs, dass von 0,6075 g Substrat 0,2874 g gebunden worden sind.

0,2638 g Pankreaspulver vermögen also in bik. alk. Lösung maximal 0,2874 g Phenylglyoxal zu binden.

In genau gleicher Weise wurde eine Kinetik mit gekochter Pankreaslösung durchgeführt. (Die angewandten Lösungen sind nicht die des vorigen Versuches.)

| Inkubationsdauer (Min.) | | Phenylglyoxal noch vorhanden mg | |
|---|---|---|---|
| Hauptvers. | Leervers. | Hauptvers. | Leervers. |
| 60 | 60 | 0,1144 | 0,1343 |
| 1260 | 1260 | 0,0376 | 0,1159 |

Es wurde in diesem Versuch nur festgestellt, dass die Phenylglyoxalabnahme auch bei gekochten Pankreaslösungen zeitlich bedingt ist. Die gebundenen Substratmengen sind von derselben

Grössenordnung wie im Versuch mit nicht gekochter Antiglyoxalaselösung.

### b) Antiglyoxalase-Glyoxalase.

Versuchsbeispiel: 70 ccm wässriger Auszug aus Schweineleber werden mit 10 ccm Pankreaslösung entsprechend 0,5 g Pankreaspulver 3,5 Stunden bei Zimmertemperatur belassen. Dann werden 300 mg Phenylglyoxalhydrat und 30 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer pH 7,5 zugegeben. Im Parallelversuch wurde die Enzymlösung allein mit Puffer 3,5 Stunden aufbewahrt und der Pankreasauszug gleichzeitig mit Substrat zugesetzt.
Reaktionsdauer 24 Stunden bei 30°.

1. Versuch mit Inkubationsdauer 24 Stunden $\alpha_D^{20}$: — 1,03°
2. „ „ „ 0 „ $\alpha_D^{20}$: — 1,61°
3. „ ohne Pankreaszusatz $\alpha_D^{20}$: — 3,45°

Zweites Versuchsbeispiel (Andere Lösungen).

1. Versuch mit Inkubationsdauer 1,5 Stunden $\alpha_D^{20}$: — 0,14°
2. „ „ „ 0 „ $\alpha_D^{20}$: — 0,23°
3. „ ohne Pankreaszusatz $\alpha_D^{20}$: — 0,70°

## 5. Glyoxalasehemmungsversuche mit gekochter Pankreaslösung.

Versuchsbeispiel: 30 ccm Pankreaslösung entsprechend 1,5 g Pankreastrockenpulver werden 1 Stunde lang auf 100° erhitzt. Davon werden 10 ccm (entsprechend 0,5 g Pankreaspulver) zu 70 ccm Leberenzymlösung und 5 ccm Phenylglyoxalhydratlösung (0,3 g Substrat) und 30 ccm $\frac{m}{5}$ Phosphatpuffer pH 7,5 gegeben. Zwei Parallelversuche zeigen an, wieviel Mandelsäure gebildet wurde, ohne Antiglyoxalaselösung und wieviel mit nicht gekochter Pankreaslösung erhalten wird. Reaktionsdauer 18 Stunden, Temperatur 30°.

1. Versuch mit gekochter Antiglyoxalaselösung $\alpha_D^{20}$: — 2,03°
2. „ „ nichtgekochter „ $\alpha_D^{20}$: — 0,69°
3. „ ohne Antiglyoxalaselösung $\alpha_D^{20}$: — 2,05°

Zweites Versuchsbeispiel (Andere Lösungen).

1. Versuch mit gekochter Antiglyoxalaselösung $\alpha_D^{20}$: — 0,64°
2. „ „ nichtgekochter „ $\alpha_D^{20}$: — 0,23°
3. „ ohne „ $\alpha_D^{20}$: — 0,70°.

Es vermag also gekochte Antiglyoxalase keine hemmende Wirkung auf Glyoxalase auszuüben. Die scheinbare Hemmung in

Versuch 2 ist auf das Abfangen von Substrat durch die Antiglyoxalaseverunreinigung zurückzuführen.

## 6. Hemmungsversuche mit Lymphe aus dem Ductus thoracicus.

1. Hauptversuch: 7 ccm Hundelymphe + 50 ccm Leberenzym + 25 ccm Phosphatpuffer pH 7,5 + 10 ccm Phenylglyoxallösung entsprechend 0,3 g Substrat.

2. Vergleichsversuch: Dieser enthält dieselben Lösungen jedoch 7 ccm Hundelymphe gekocht.

Versuchsdauer 15 Stunden, Temperatur 30°.

Hauptversuch $\alpha D^{20}$: — 3,60°
Vergleichsversuch gekochte Lymphe $\alpha D^{20}$: — 3,50°.

2. Versuchsbeispiel:

1. Hauptversuch: 10 ccm Hundelymphe + 70 ccm Leberenzym + 30 ccm Phosphatpuffer pH 7,5 + 10 ccm Phenylglyoxallösung entsprechend 0,3 g Substrat.

2. Vergleichsversuch: Dieser enthält dieselben Lösungen, jedoch 10 ccm Hundelymphe gekocht.

Versuchsdauer 15 Stunden, Temperatur 30°.
Hauptversuch $\alpha D^{20}$: — 3,05°
Vergleichsversuch gekochte Lymphe $\alpha D^{20}$: — 2,91°.

## 7. Hemmungsversuche mit Bauchspeichel.

1. Hauptversuch: 14 ccm Hundebauchspeichel + 60 ccm Leberenzym + 10 ccm Phenylglyoxallösung entsprechend 0,3 g Substrat + 30 ccm Phosphatpuffer pH 7,5 werden zu gleicher Zeit zusammengegeben.

2. Vergleichsversuch: Dieser enthält dieselben Reaktionskomponenten, jedoch anstatt 14 ccm Pankreassaft 14 ccm destilliertes Wasser.

Versuchsdauer 15 Stunden, Temperatur 30°.
Hauptversuch $\alpha D^{20}$: — 0,52°
Leerversuch $\alpha D^{20}$: — 0,58°.

2. Versuchsbeispiel:

11 ccm Hundebauchspeichel + 60 ccm Leberglyoxalaselösung + 10 ccm Phenylglyoxallösung = 250 mg Substrat + 30 ccm Phosphatpuffer pH 7,5.

2. Vergleichsversuch: Dieser enthält dieselben Reaktionskomponenten, jedoch 11 ccm Bauchspeichel gekocht.

Versuchsdauer 15 Stunden, Temperatur 30°.
Hauptversuch $\alpha D^{20}$: — 0,47°
Leerversuch (gekochter Bauchspeichel) $\alpha D^{20}$: — 0,70°.

## 8. Hemmung der Hefeglyoxalase durch Antiglyoxalase.

### a) Autolysate.

#### 1. Versuchsbeispiel.

1. Hauptversuch: 20 ccm Bastautolysat (6. 8. 26) entsprechend 5 g Frischhefe werden mit 0,5 g Pankreaspulver, 30 ccm Phosphatpuffer pH 6 und Substratlösung entsprechend 0,3 g Phenylglyoxalhydrat angesetzt.

2. Leerversuch: Dieser enthält dieselben Reaktionskomponenten, jedoch kein Pankreaspulver.

Versuchsdauer 15 Stunden, Temperatur 30°.
Hemmungsversuch $\alpha D^{20}$: — 0,14°
Leerversuch $\alpha D^{20}$: — 1,63°.

#### 2. Versuchsbeispiel.

1. Hauptversuch. 10 ccm Hefeautolysat (Oltenhefe (9. 2. 27) entsprechend 7 g Frischhefe + 10 ccm Bikarbonat-Auszug entsprechend 0,5 g Pankreaspulver + 30 ccm Phosphatpuffer pH 6 + 10 ccm Phenylglyoxallösung entsprechend 0,3 g Substrat.

2. Vergleichsversuch. Dieser enthält die gleichen Reaktionskomponenten, jedoch anstatt 10 ccm Bikarbonat-Auszug 10 ccm 1-prozentige Natriumbisulfitlösung. Versuchsdauer 18 Stunden, Temperatur 30°.

Hemmungsversuch $\alpha D^{20}$: — 0,70°
Leerversuch $\alpha D^{20}$: — 2,33°.

### b) Frischhefe.

#### Versuchsbeispiel.

1. Hemmungsversuch. 5 g Frischhefe (Hefe Olten vom 9.4.27) + 10 ccm Antiglyoxalaselösung entsprechend 0,5 g Trockenpulver + 30 ccm Phosphatpuffer + 10 ccm Substratlösung entsprechend 300 mg Phenylglyoxalhydrat.

2. Vergleichsversuch. Dieser enthält dieselben Reaktionskomponenten wie der Hauptversuch, jedoch anstatt 10 ccm Antiglyoxalaselösung 10 ccm 1-prozentige Natriumbikarbonatlösung.

Versuchsdauer 15 Std., Temperatur 30°.
Hemmungsversuch $\alpha D^{20}$: — 1,11°
Vergleichsversuch $\alpha D^{20}$: — 1,74°.

## 9. Antiglyoxalase und Erbsenglyoxalase.

Mit einem wässrigen Erbsenauszug wurde geprüft, ob Erbsenglyoxalase durch Antiglyoxalase hemmbar sei. Die dismutierende Wirkung der verwendeten Erbsenenzymlösung war sehr gering, doch spricht das Versuchsergebnis dafür, dass auch die Ketoaldehydmutase der Erbsen durch Antiglyoxalase inaktiviert wird. Im Versuch ohne Hemmung wurden 3,3 mg d (—) Mandelsäure, im Hemmungsversuch 2,0 mg d (—) Mandelsäure gebildet.

## 10. Hemmungsversuch bei der Milchsäuregärung.

Versuchsbeispiel.

1. Hauptversuch. In 55 ccm Reaktionslösung befinden sich 5 ccm einer dichten Aufschlämmung von Bact. acidi lactici Hüppe, 20 ccm Pankreasauszug entsprechend 0,5 g Trockenpulver, 0,7 g Glukose (wasserfrei) und 30 ccm Phosphatpuffer pH 7,5.

2. Vergleichsversuch. Dieser ist genau so zusammengesetzt wie der Hauptversuch, jedoch wurde die zugesetzte Pankreaslösung 20 Minuten lang gekocht. Versuchsdauer 15 Std., Temperatur 30°. Die Gärung wird durch Zugabe von 5 ccm 25-prozentiger Phosphorsäure unterbrochen. Darauf wird mit gep. Ammonsulfat gesättigt und filtriert. Nun wird nach O. Ohlson[33] die Milchsäure dem Reaktionsgemisch durch Ausschütteln mit Amylalkohol entzogen. Aus der amylalkoholischen Lösung wird die Milchsäure in Sodalösung übergeführt durch fünfmaliges Ausschütteln des Amylalkohols mit 2n-Sodalösung. Diese wird auf dem Wasserbad zur Vertreibung des Amylalkohols zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, schwach angesäuert und im Messkölbchen auf 100 ccm verdünnt. 30 ccm dieser Lösung dienten zur Milchsäurebestimmung nach Fürth und Charnass.

Bisulfitverbrauch für 30 ccm Milchsäurelösung des Hemmungsversuches } 4,06 ccm $\frac{n}{10}$ entspricht 182,7 mg Milchsäure

Bisulfitverbrauch für 30 ccm Milchsäurelösung des Vergleichsversuches } 4,13 ccm $\frac{n}{10}$ entspricht 185,8 mg Milchsäure.

Die beiden Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen der Methode überein.

Je 30 ccm der beiden Milchsäurelösungen wurden nach R. O. Herzog und P. Slansky[34] mit Ammonmolybdat versetzt, sodass die Lösung in Bezug auf dieses Salz 10-prozentig war, und dann im 2 dm-Rohr polarisiert. Sie zeigten keine optische Aktivität.

---

[33] l. c. 28. [34] H. S. Bd. 73, S. 240.

# VIII. Versuche zur Reinigung der Antiglyoxalase.

Aus der Diskussion zur Natur der Antiglyoxalasewirkung sind die Gründe zu ersehen, die es wünschenswert erscheinen liessen, die Antiglyoxalase in gereinigter Form zu erhalten. Mit den zur Reinigung angewandten Mitteln konnte jedoch die Antiglyoxalasewirkung nicht gesteigert werden, auch war es unmöglich die Antiglyoxalase frei von den verunreinigenden mit dem Substrat der Glyoxalase reagierenden Körpern zu erhalten.

## 1. Dialysierversuche mit Antiglyoxalaselösungen.

Zunächst wurden wechselnde Mengen Antiglyoxalaselösungen in Fischblasen dialysiert und dabei die Angabe Dakins bestätigt gefunden, dass Antiglyoxalase nicht dialysierbar ist. Durch Zusatz der Dialysate zu Glyoxalaselösungen konnte keine Hemmung der Mandelsäurebildung erzeugt werden. Bei der Untersuchung der Hemmungsfähigkeit der in der Fischblase zurückbleibenden Antiglyoxalaselösungen zeigte es sich, dass diese stark zurückgegangen war. Die Antiglyoxalase geht also bei genügend langer Dialyse zugrunde.

Versuchsbeispiele. In einer Fischblase wurden 25 ccm Bikarbonatauszug entsprechend 5 g Pankreastrockenpulver 24 Stunden lang dialysiert. Die Aussenflüssigkeit 23 ccm wurde zu Hefeenzym zugesetzt, Phenylglyoxal und Pufferlösung zugegeben. Im Hemmungsversuch wurden 53 mg d (—) Mandelsäure gebildet, im Versuch ohne Hemmung 52 mg. Daraus geht einwandfrei hervor, dass Antiglyoxalase nicht dialysierbar ist. 30 ccm Antiglyoxalaselösung entsprechend 0,75 g Trockenpulver werden 24 Stunden dialysiert. Der Inhalt der Fischblase wird darnach in Glyoxalaselösung übergeführt und die Hemmung der Mandelsäurebildung festgestellt. Zwei gleichzeitig unter denselben Bedingungen angestellte Versuche geben Aufschluss darüber wieviel Mandelsäure vom Leberenzym mit 30 ccm nichtdialysierter Antiglyoxalaselösung und wieviel ohne den Hemmungskörper gebildet wird. Aus den Versuchsdaten geht hervor, dass die Antiglyoxalase durch die Dialyse etwa die Hälfte ihrer hemmenden Kraft verloren hat.

1. Versuch ohne Hemmung $\alpha D^{20}$ 2 dm-Rohr $-2{,}86^0$
2. Versuch mit 30 ccm nicht dial. Anti. L. $\alpha D^{20}$ „ „ $-1{,}04^0$ $^0/_0$ Hemmung 63,6.
3. Versuch mit 30 ccm dialys. Antigl. Lösg. $\alpha D^{20}$ „ „ $-1{,}79^0$ $^0/_0$ Hemmung 37,4.

In gleicher Weise wurden 20 ccm Antiglyoxalaselösung entsprechend 0,5 g Trockenpulver 18 Stunden lang dialysiert. Nach der Dialyse war keine Antiglyoxalasewirkung mehr feststellbar.

1. Versuch ohne Hemmung $\alpha_D^{20}$ 2 dm-Rohr $-2{,}32^0$
2. Versuch mit 20 ccm nicht dial. Anti. L. $\alpha_D^{20}$ „ „ $-1{,}46^0$
3. Versuch mit 20 ccm dial. Antigl. Lösg. $\alpha_D^{20}$ „ „ $-2{,}61^0$

## 2. Adsorptionsversuche mit Antiglyoxalase.

Die Adsorptionsversuche mit Antiglyoxalase wurden in der für die Adsorption von Glyoxalase beschriebenen Weise vorgenommen. Als Adsorptionsmittel wurden wieder angewandt $Al(OH)_3C\gamma$, $SiO_2$, gepulverter Asbest, Kaolin „Plauson" und Tierkohle. Tonerde und Kaolin nehmen Antiglyoxalase auf, Kieselsäure ebenfalls, doch nur in essigsaurer Lösung. Tierkohle verschiedener Herkunft adsorbiert verschieden stark. Tierkohle Siegfried Zofingen adsorbiert nur schwach. Gepulverter Asbest adsorbiert nicht.

Beispiele für Antiglyoxalaseadsorption.

| Adsorptionsmittel | | Reaktion d. Antiglyoxalaselösung | $\alpha_D^{20}$ des Hemmungsversuches 2 dm-Rohr (°) | $\alpha_D^{20}$ des Versuches ohne Hemmung 2 dm-Rohr (°) | $\alpha_D^{20}$ des Versuches mit Hemmung 2 dm-Rohr (°) |
|---|---|---|---|---|---|
| Asbest gep. | 5 g | neutral | $-0{,}18$ | $-1{,}56$ | $-0{,}15$ |
| Kaolin „Plauson" | 2 g | „ | $-0{,}64$ | $-1{,}56$ | $-0{,}15$ |
| $Al(OH)_3C\gamma$ | 30 ccm | „ | $-0{,}79$ | $-1{,}56$ | $-0{,}15$ |
| $SiO_2$ gepulv. | 5 g | „ | $-0{,}32$ | $-2{,}18$ | — |
| $SiO_2$ „ | 5 g | „ | $-0{,}84$ | $-2{,}56$ | $-0{,}91$ |
| $SiO_2$ „ | 5 g | essigsauer | $-2{,}43$ | $-2{,}56$ | $-0{,}91$ |
| Tierkohle Siegfried | 2,5 g | neutral | $-1{,}07$ | $-2{,}56$ | $-0{,}91$ |

Die für die Kinetik der Phenylglyoxalbindung durch Pankreaspräparate verwendete Antiglyoxalaselösung (s. S. 88) wurde zuerst mit 8 g Tierkohle Siegfried, dann mit 7 g gepulverter Kieselsäure gereinigt, wodurch das Trockengewicht der Lösung auf die Hälfte der ursprünglichen sank.

## 3. Elutionsversuche.

Die Elutionsversuche mit adsorbierter Antiglyoxalase, die in der für die Elution der Glyoxalase angegebenen Weise mit sauren und alkalischen Eluentien durchgeführt wurden, führten zu keinem positiven Ergebnis. Nach meinen Versuchen ist Antiglyoxalase wohl adsobierbar aber nicht eluierbar. In allen Fällen, in denen mit gereinigter Antiglyoxalaselösung Hemmung auftrat, war auch die Gelbfärbung zu beobachten.

# Lebenslauf.

Am 10. Oktober 1902 bin ich zu Kaiserslautern als Sohn des Werkmeisters Heinrich Werle geboren. Ich besuchte vier Jahre die Volksschule und dann neun Jahre die Oberrealschule zu Kaiserslautern, die ich Ostern 1922 absolvierte. Im Sommersemester desselben Jahres begann ich das Studium der Chemie an der Universität München. Am Ende des Sommersemesters 1924 unterzog ich mich dem 1. Verbandsexamen. Nach Ablegung der 2. Verbandsprüfung am 4. Dezember 1925 arbeitete ich unter Leitung des Herrn Professor Dr. Richard Kuhn an meiner Doktorarbeit, zunächst in München, seit Herbst 1926 in Zürich, wohin ich meinem Lehrer nach dessen Berufung an die Eidgenössische Technische Hochschule folgte.